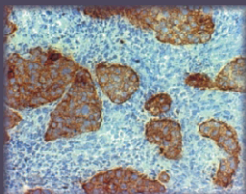
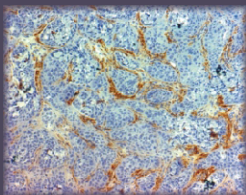
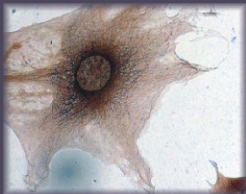
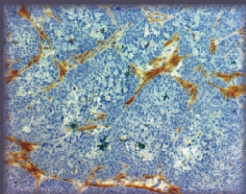
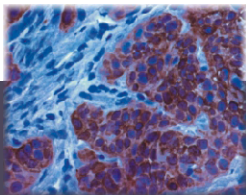
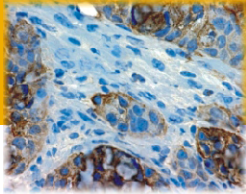


# EINFLUSS VON TUMOR-STROMA-INTERAKTIONEN AUF DAS CHEMORESISTENZVERHALTEN VON PANKREASKARZINOMZELLEN IN VITRO UND IN VIVO



**VERONIKA WERBING**

## INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem  
Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. E. Burkhardt  
und  
Labor für Molekulare Gastroenterologie und Hepatologie  
Klinik für Allgemeine Innere Medizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein  
Campus Kiel  
Betreuer: Prof. Dr. H. Schäfer

**Einfluss von Tumor-Stroma-Interaktionen  
auf das Chemoresistenzverhalten  
von Pankreaskarzinomzellen  
in vitro und in vivo**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**VERONIKA WERBING**

Tierärztin aus Ostercappeln

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

---

Gutachter: Prof. Dr. E. Burkhardt

Prof. Dr. H. Schäfer

Tag der Disputation: 13. Juni 2006

---

# I INHALTSVERZEICHNIS

I	INHALTSVERZEICHNIS	I
---	--------------------	---

II	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
----	-----------------------	----

## **1. Einleitung** **1**

1.1.	Pankreaskarzinom	1
1.1.1.	Epidemiologie	1
1.1.2.	Risikofaktoren	1
1.1.3.	Pathologie	2
1.1.4.	Therapie	3
1.2.	Chemoresistenz	4
1.3.	Verschiedene Formen von Zelltod	6
1.3.1.	Bedeutung und charakteristische Merkmale der Apoptose	7
1.3.2.	Molekulare Mechanismen der Apoptose-Signalwege	8
1.3.2.1.	Caspasen	8
1.3.2.2.	Extrinsischer Signalweg	9
1.3.2.3.	Intrinsischer Signalweg	10
1.3.2.4.	Inhibitorische Regulation von Apoptose-Signalwegen	10
1.3.2.5.	Aktivierung von Apoptose-Signalwegen durch Zytostatika	11
1.4.	Ziel dieser Arbeit	12

## **2. Materialien und Geräte** **13**

2.1.	Zellen und Zelllinien	13
2.2.	Materialien und Geräte für die Isolierung und Expansion von murinen Pankreasfibroblasten	13
2.3.	Zellkultur	13
2.3.1.	Medien und Medienzusätze	13
2.3.2.	Sonstige Materialien und Geräte für die Zellkultur	13
2.4.	Substanzen für die Behandlung der Zellen	14
2.5.	Materialien und Geräte für die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	14
2.6.	Materialien und Geräte für die Proteingewinnung	15

2.6.1.	Materialien und Geräte für die Herstellung von Kernextrakten	15
2.6.2.	Materialien und Geräte für die Herstellung von Ganzzelllysaten	15
2.7.	Materialien und Geräte für die Proteinbestimmung	15
2.8.	Materialien und Geräte für die SDS-Gelelektrophorese und Western Blotting	16
2.9.	Antikörper für Western Blotting	17
2.9.1.	Primärantikörper	17
2.9.2.	Sekundärantikörper	17
2.10.	Materialien und Geräte für die RNA-Isolierung	17
2.11.	Materialien und Geräte für die Herstellung von cDNA	18
2.12.	Materialien und Geräte für die Realtime-PCR	18
2.13.	Materialien und Geräte für ELISA	19
2.14.	Materialien und Geräte für die Tierhaltung	19
2.15.	Materialien und Substanzen für die Behandlung der Tiere sowie für die Organentnahme	19
2.16.	Materialien und Geräte für die Immunzytologie und Immunhistologie	20
2.17.	Antikörper und Detektionssysteme für die Immunzytologie und Immunhistologie	20
2.17.1.	Primärantikörper und Blockierungspeptide	20
2.17.2.	Sekundärantikörper und immunhistologische Detektionssysteme	21
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	<b>22</b>
3.1.	Isolierung und Expansion von murinen Pankreasfibroblasten	22
3.2.	Zellkultur	23
3.2.1.	Mono-Kultivierung von humanen Panc89-Zellen und murinen Pankreasfibroblasten	23
3.2.2.	Co-Kultivierung von humanen Panc89-Zellen und murinen Pankreas- fibroblasten, Generierung von „Mono-aus-Co“ (MaC)-Zellen	23
3.3.	Messung der Zellvitalität mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	25
3.3.1.	Prinzip der Methode	25
3.3.2.	Durchführung	26
3.4.	Proteintechniken	26
3.4.1.	Proteingewinnung	26

3.4.1.1.	Herstellung von Kernextrakten	26
3.4.1.2.	Herstellung von Ganzzelllysaten	27
3.4.2.	Proteinkonzentrationsbestimmung	28
3.4.3.	Proteinnachweis	28
3.4.3.1.	Einstellung der Proben auf identischen Gesamtproteingehalt	28
3.4.3.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
3.4.3.3.	Proteintransfer (Western Blotting)	30
3.4.3.4.	Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper	31
3.4.3.5.	Detektion mittels Chemolumineszenz	32
3.5.	RNA-Techniken	33
3.5.1.	RNA-Isolierung	33
3.5.2.	Herstellung von cDNA	33
3.5.2.1.	Prinzip der Methode	33
3.5.2.2.	Durchführung	33
3.6.	DNA-Techniken	34
3.6.1.	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (Realtime Polymerase Chain Reaction = Realtime-PCR)	34
3.6.1.1.	Prinzip der Methode	34
3.6.1.2.	Durchführung	35
3.6.1.3.	Relative Quantifizierung des PCR-Produktes	35
3.7.	Enzym-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)	36
3.7.1.	Prinzip der Methode	36
3.7.2.	Durchführung	36
3.7.2.1.	NF- $\kappa$ B-ELISA	36
3.7.2.2.	IL1 $\beta$ -ELISA	36
3.8.	Tierexperimentelle Methoden	37
3.9.	Immunzytologie	38
3.9.1.	Charakterisierung von murinen Pankreasfibroblasten mittels Immunzytologie	39
3.10.	Immunhistologie	40
3.10.1.	Durchführung	40
3.10.2.	Antikörper und Detektionssysteme	41
3.10.3.	Auswertung der immunhistologischen Schnitte	41
3.10.3.1.	Pan-Cytokeratin und “ $\alpha$ -Smooth Muscle Actin“ ( $\alpha$ -SMA)	41

3.10.3.2.	<i>“Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling“ (TUNEL)</i>	42
3.10.3.3.	Ki67	42
3.10.3.4.	Procaspasen	42
3.11.	Statistik	43
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
4.1.	Isolation und Expansion muriner Pankreasfibroblasten	44
4.2.	Charakterisierung der isolierten Pankreasfibroblasten mittels immunzytologischer Färbung	45
4.3.	Versuche in vitro: Vergleich von kokultivierten und monokultivierten Panc89-Zellen	46
4.3.1.	Apoptosemessung mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	46
4.3.2.	NF- $\kappa$ B Status	50
4.3.3.	IL1 $\beta$ -Sekretion	52
4.3.4.	Procaspase-Expression und Caspase-Aktivierung auf Proteinebene	54
4.3.4.1.	Procaspase-Expression auf Proteinebene	54
4.3.4.2.	Caspase-Aktivierung	56
4.3.4.3.	Expression der Caspase-Inhibitoren cIAP1, cIAP2 und XIAP	58
4.3.4.4.	Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 nach Behandlung der Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132	60
4.3.5.	Procaspase-Expression auf RNA-Ebene	62
4.3.6.	Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 auf Proteinebene nach Behandlung der Zellen mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin	67
4.3.7.	Apoptosemessung mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie nach Behandlung der Zellen mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin	69
4.3.8.	Aktivierung der MAP-Kinasen <i>“Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2“</i> (Erk1/Erk2)	71
4.3.9.	Apoptosemessung mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie nach Behandlung der Zellen mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059	72



---

4.3.10.	Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 auf Proteinebene nach Behandlung der Zellen mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059	74
4.3.11.	Expression des Adhäsionsmoleküls L1CAM	76
4.4.	Versuche in vivo: Vergleich von Panc89 Mono-und Co-Tumoren	77
4.4.1.	Tumorstadium	77
4.4.1.1.	Tumorstadium	77
4.4.1.2.	Proliferation (Immunhistologische Färbung Ki67)	78
4.4.2.	Epithelialer und stromaler Anteil der Tumore	79
4.4.2.1.	Cytokeratin	79
4.4.2.2.	$\alpha$ -SMA	82
4.4.3.	Tumorstadium nach Behandlung der Tiere mit Etoposid bzw. 0,9%iger Natriumchloridlösung	85
4.4.4.	Anzahl apoptotischer Zellen nach Behandlung der Tiere mit Etoposid bzw. 0,9%iger Natriumchloridlösung (Immunhistologische Färbung TUNEL)	86
4.4.5.	Proliferation der Tumore nach Behandlung der Tiere mit Etoposid bzw. 0,9%iger Natriumchloridlösung (Immunhistologische Färbung Ki67)	89
4.4.6.	Expression der Procaspasen 9, 3 und 7	90
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>94</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>109</b>
<b>7.</b>	<b>Summary</b>	<b>110</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>111</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>119</b>

---

## II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
$\alpha$ -SMA	alpha-Smooth Muscle Actin
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromol
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AIF	Apoptosis Inducing Factor
AP-1	Activating Protein 1
AP-4	Activating Protein 4
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor-1
ATP	Adenosintriphosphat
Aza	5-Azacytidin
BIR	Baculovirus IAP Repeat
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CAD	Caspase Activated DNAase
CARD	Caspase Recruitment Domain
cDNA	complementary DNA
CEACAM 6	Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 6
cIAP1	cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1
cIAP2	cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 2
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikzenimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
cryst.	crystalloid
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat

---

dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
d.h.	das heisst
DIABLO	Direct IAP-binding protein with low pI
DISC	Death-inducing Signaling Complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
Erk 1	Extracellular Signal-Regulated Kinase 1
Erk 2	Extracellular Signal-Regulated Kinase 2
Eto	Etoposid
FADD	Fas-associated Death Domain Protein
FAK	Focal Adhesion Kinase
Fas-L	Fas-Ligand
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLIP	FADD-like ICE inhibitory proteins
FSC	Forward Scatter
g	Gramm
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPF	High Powered Field (400fache Vergrößerung)
HRP	Horseradish-Peroxidase
HSP90	Heat Shock Protein 90
IAP	Inhibitor of Apoptosis
ICE	Interleukin 1 Converting Enzyme
IgG	Immunglobulin G

---

IL1 $\beta$	Interleukin 1 beta
iNOS	inducible NO-Synthetase
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
l	Liter
L1CAM	L1 Cellular Adhesion Molecule
LRP	Lung Resistance Protein
mA	Milliampere
MaC-Zellen	„Mono aus Co“-Zellen
MAP-Kinase	Mitogen-activated-Protein-Kinase
MDR	Multidrug Resistance
mg	Milligramm
min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
M	molar
mM	millimolar
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger RNA
MRP-1	Multidrug Resistance Related Protein 1
NaCl	Natriumchlorid
NER	Nucleotide Excision Repair
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa B
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NRS	Normal Rabbit Serum
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pg	Pikogramm
P-gp	P-glycoprotein
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PKB/Akt	Protein Kinase B

---

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q1 bis Q4	Quadrant 1 bis 4
RNA	Ribonucleic Acid
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
SBTI	Soy Bean Trypsin Inhibitor
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	small interference Ribonucleic Acid
Smac	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine
SSC	Side Scatter
Tab.	Tabelle
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor alpha
TUNEL	Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling
TRADD	TNF-Receptor-associated Death Domain Protein
TRAIL	TNF-related Apoptosis-inducing Ligand
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
u.a.	unter anderem
ub	unbehandelt
U/ $\mu$ l	Units pro Mikroliter
U/ml	Units pro Milliliter
U/min	Umdrehungen pro Minute
ü.N.	über Nacht
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
z.B	zum Beispiel



---

# **1. Einleitung**

## **1.1. Pankreaskarzinom**

### **1.1.1. Epidemiologie**

Die Inzidenz des Pankreaskarzinoms beträgt in Deutschland bei Frauen 18,3 und bei Männern 14,4 pro 100.000 Einwohner und Jahr. Mit einer Zahl an jährlichen Neuerkrankungen von etwa 7700 bei Frauen und 5700 bei Männern macht das Pankreaskarzinom 3,5% aller Krebserkrankungen aus. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Frauen bei 75 Jahren, für Männer bei 68 Jahren. Pankreaskarzinome sind mit einer ausgesprochen niedrigen Fünf-Jahres-Überlebensrate (ca. 2%) die vierthäufigste Krebstodesursache bei Frauen und die fünfhäufigste bei Männern [Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2004; Bohmig and Rosewicz 2004].

### **1.1.2. Risikofaktoren**

Fortgeschrittenes Lebensalter sowie Zigarettenrauchen werden durchgehend als Risikofaktoren für das Pankreaskarzinom genannt. Auch das Vorkommen von Pankreaskarzinomen in der Familie und andere genetische Prädispositionen (u.a. familiäre Pankreatitis) sind als Risiko zu werten [Li et al. 2004].

Mögliche Risikofaktoren können auch in der individuellen medizinischen Vorgeschichte liegen. So hat eine Studie mit mehr als 2000 Patienten, die an chronischer Pankreatitis erkrankt waren, gezeigt, dass diese Patienten ein signifikant höheres Risiko hatten, in den Folgejahren ein Pankreaskarzinom zu entwickeln. In einem Beobachtungszeitraum von fünf Jahren war das Risiko dabei um das Vierzehnfache erhöht [Lowenfels et al. 1993]. Diabetes mellitus Typ II wird sowohl als eine mögliche Ursache als auch als ein frühes Symptom des Pankreaskarzinoms diskutiert. Eine Analyse verschiedener Studien zeigt, dass ein moderater kausaler Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus Typ II und der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms besteht [Huxley et al. 2005].

Als mögliche Risikofaktoren werden zudem noch viele weitere Erkrankungen (z.B. Tumore der Schilddrüse oder andere benigne endokrine Tumore) und Lebensgewohnheiten (z.B. Fleischkonsum) diskutiert [Lillemoe et al. 2000].

### 1.1.3. Pathologie

Über 90% aller humanen Pankreastumore entstammen den exokrinen Organanteilen und sind histologisch als duktale Adenokarzinome zu klassifizieren. Azinuszellkarzinome sowie zystische Neoplasien des Pankreas, die ihren Ursprung ebenfalls im exokrinen Teil des Organs haben, sind sehr viel seltener. Endokrine Tumore und zu einem geringen Anteil Lymphome stellen den übrigen Teil der primären Pankreastumore dar.

Die häufigste Primärlokalisation des dukталen Adenokarzinoms ist mit ca. 65% der Pankreaskopf. Pankreaskorpus und -schwanz sind in ca. 15% der Fälle primär betroffen, während ca. 20% der dukталen Adenokarzinome das gesamte Pankreas diffus involvieren.

Die Ausbreitung erfolgt zunächst in das peripankreatische Gewebe (umgebendes retroperitoneales Fettgewebe, Mesenterium, Mesokolon, großes und kleines Netz sowie Peritoneum). Der Tumor kann durch die weitere lokale Ausbreitung das Duodenum, den Magen, die Milz, das Kolon und die Nebennieren infiltrieren. Häufig findet auch eine perineurale Tumordinfiltration sowie eine Invasion der benachbarten großen Gefäße (Vena portae, Vena mesenterica superior, Arteria mesenterica superior) statt. Frühzeitig metastasiert das Adenokarzinom in die regionalen Lymphknoten sowie hämatogen in Leber, Lunge, Pleura, Skelettsystem, Nebennieren und Peritoneum [Bohmig and Rosewicz 2004; Lillemoe et al. 2000].

Charakteristisch für das duktale Pankreasadenokarzinom ist eine ausgeprägte desmoplastische Stromabildung. Der Anteil an Stromazellen, hauptsächlich nicht-neoplastische Fibroblasten, Endothelzellen und Leukozyten, übersteigt dabei denjenigen der neoplastischen Epithelzellen [Ryu et al. 2001; Seymour et al. 1994].

Komplexe Interaktionen zwischen den neoplastischen Pankreasepithelzellen und den zellulären und nicht zellulären Stromakomponenten haben Einfluss auf das Wachstum [Hartel et al. 2004; Miyamoto et al. 2004], auf die Invasivität, die Migration und das angiogenetische Potential [Tomioka et al. 2001] sowie auf die Chemoresistenz [Miyamoto et al. 2004; Muerkoster et al. 2004] von Pankreasadenokarzinomen.

Ferner ist das Pankreaskarzinom durch eine Reihe molekularbiologischer Veränderungen gekennzeichnet, die u.a. als Ursache für eine deregulierte Zellteilung und damit einhergehend dereguliertes Wachstum gesehen werden können. So weisen 90% aller Pankreaskarzinome eine Mutation im k-ras Gen auf, 80-90% der Tumore Mutationen im CDKN2a/INK4a/p16 Gen und 50% Mutationen im p53 Gen [Schneider and Schmid 2005; Schneider et al. 2005].

Auch wird die konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors “*Nuclear Factor kappa B*“ (NF-κB) in 67-90% der Pankreaskarzinome gefunden [Muerkoster et al. 2005; Wang et al.



1999] und vor allem im Zusammenhang mit einer verminderten Apoptosefähigkeit verstanden, so dass dadurch nicht nur die Karzinogenese, sondern auch die Therapieresistenz dieser Tumore zu erklären ist [Arlt et al. 2001; Schneider and Schmid 2005].

#### **1.1.4. Therapie**

Die einzige Therapieform mit kurativer Zielsetzung ist die Tumorresektion, die in der Regel bei Pankreaskopftumoren als partielle Duodenopankreatektomie bzw. pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie durchgeführt wird. Dieser kurative Ansatz ist jedoch nur bei 15-20% der Patienten möglich, bei denen der Tumor zum Zeitpunkt der Diagnosestellung die umliegenden großen Gefäße noch nicht infiltriert hat. Obwohl es die Methode mit den größten Erfolgsaussichten ist, überleben lediglich 20% dieser Patienten die folgenden fünf Jahre. Als adjuvante Therapie kommen eine kombinierte Radiochemotherapie oder eine systemische Chemotherapie in Frage [Li et al. 2004].

Aufgrund des hohen Malignitätsgrades und des Fehlens spezifischer Symptome wird das duktale Pankreasadenokarzinom jedoch in über 80% der Fälle erst in einem bereits fortgeschrittenen Krankheitsstadium diagnostiziert [Brand and Tempero 1998], so dass sich der Tumor als nicht resezierbar erweist. Zusätzlich weisen mehr als 60% der Patienten bei der Erstdiagnose bereits Fernmetastasen auf [Hohenberger and Kastl 2000]. In diesen Fällen ist der Therapieansatz eine rein palliative Chemotherapie. Die objektive Ansprechrate des Tumors liegt dabei unter 20%, komplette Remissionen werden so gut wie nie erreicht [Bohmig and Rosewicz 2004]. Bei der Chemotherapie gilt es, mögliche palliative Vorteile gegen eine zusätzliche Patientenbelastung durch die Therapie abzuwägen. Als Standardtherapie beim metastasierten Pankreaskarzinom gelten zur Zeit Gemcitabine oder 5-Fluorouracil [Li et al. 2004].

Neben diesen Standardverfahren (Operation, Radiotherapie, Chemotherapie mit Zytostatika) werden in klinischen Studien neue, ergänzende Therapieansätze -wie z.B. die Immuntherapie- erprobt, mit deren Hilfe die Effizienz der bisherigen Behandlungsstrategien verbessert werden soll.

---

## **1.2. Chemoresistenz**

Eine Chemotherapie zur Behandlung von Neoplasien kann aus verschiedenen Gründen versagen. Die individuelle Stoffwechsellage des Patienten beeinflusst die pharmakokinetischen Eigenschaften des Zytostatikums, z.B. die Metabolisierung, so dass unter Umständen ein ausreichender Wirkspiegel am Zielort nicht erreicht werden kann. Dieses kann zur Ausprägung einer klinischen Resistenz beitragen. Den entscheidenden Faktor für das schlechte Ansprechen verschiedener Neoplasien auf Zytostatika stellen aber Resistenzmechanismen der Tumorzellen selbst dar [Gatti and Zunino 2005].

Die Chemoresistenz der Tumorzellen kann bereits vor einer Behandlung vorhanden sein (intrinsische Resistenz) [Arlt et al. 2002; Muerkoster et al. 2004] oder sich erst während der Zytostatikatherapie entwickeln (extrinsische Resistenz) [Banerjee et al. 2002; Kang et al. 2004]. Eine besondere Rolle bei der Resistenzentwicklung spielen autokrine oder parakrine Mechanismen wie z.B. die Sekretion von IL1 $\beta$ , die durch Interaktionen der Tumorzellen untereinander oder mit dem umgebenden Stroma entstehen können [Muerkoster et al. 2006].

Verschiedene Chemoresistenzmechanismen sind beschrieben worden. Sie umfassen zum einen solche, durch die die Tumorzelle direkten Einfluss auf die Aufnahme des Pharmakons in die Zelle, auf dessen Verteilung in der Zelle, auf dessen Interaktion mit der Zielstruktur, auf dessen Biotransformation sowie auf dessen Elimination aus der Zelle nimmt.

Zum anderen sind Chemoresistenzmechanismen beschrieben, durch die die Zelle sich auf andere Weise dem Einfluss des Zytostatikums entzieht. Dazu gehören u.a. die Reparatur geschädigter DNA, die Regulation des Zellzyklus sowie die Apoptoseresistenz.

Die Aufnahme des Zytostatikums in und die Elimination aus der Zelle werden beeinflusst durch den Membrantransport, der in Tumorzellen dahingehend verändert sein kann, dass die Zytostatikumkonzentration in der Zelle gesenkt wird. Erreicht wird dieses u.a. durch eine Überexpression des Transporters "*P-glycoprotein*" (P-gp), der ein Produkt des "*Multidrug Resistance*" (MDR) Gens ist. Unter physiologischen Bedingungen schützt P-gp die Zelle gegen Toxine, wohingegen es in Tumorzellen zur Ausprägung von Chemoresistenz beiträgt. Das Spektrum von Substraten, die von P-gp transportiert werden, schließt dabei viele gebräuchliche Zytostatika ein (z.B. Doxorubicin, Etoposid) [Jamroziak and Robak 2004]. Andere Transporter, wie z.B. das "*Multidrug Resistance Related Protein 1*" (MRP-1) senken ebenfalls die Konzentration des Zytostatikums in der Zelle, indem sie dessen Aufnahme

vermindern und/oder dessen Elimination beschleunigen [Cole et al. 1992; Ichihashi and Kitajima 2001].

Zu einer veränderten intrazellulären Verteilung führt u.a. die Aufnahme des Zytostatikums in zytoplasmatische Organellen. Die Interaktion zwischen Medikament und Zielstruktur wird gestört und auf diese Weise die Zytotoxizität vermindert [Larsen et al. 2000]. Ein Beispiel ist das "*Lung Resistance Protein*" (LRP), das eine Verteilung von Doxorubicin vom Zellkern in das Zytoplasma bewirkt, ohne die Gesamtkonzentration des Zytostatikums in der Zelle zu erniedrigen [Kitazono et al. 1999].

Eine gestörte Interaktion mit der Zielstruktur kann die Wirkung des Zytostatikums schwächen. Die Zielstruktur kann entweder von vornherein für das Zytostatikum schwer angreifbar sein oder sich diesem durch Veränderungen entziehen. Veränderungen der Zielstruktur können z.B. die DNA-Topoisomerase II betreffen. Das Enzym ist Angriffspunkt einiger Zytostatikaklassen, zu denen u.a. Anthrazykline (Doxorubicin) und Epipodophyllotoxine (Etoposid) zählen. Ihre Wirkung besteht vor allem darin, stabile DNA-Topoisomerase II-Komplexe zu bilden, die zu vermehrten DNA-Doppelstrangbrüchen führen. Die Zelle versucht, sich der Zytostatikawirkung durch verminderte Expression oder Deaktivierung der Topoisomerase II zu entziehen [Shain and Dalton 2001].

Die vermehrte Detoxifikation von Zytostatika durch eine veränderte Expression von metabolischen Enzymen, z.B. der Glutathion-S-Transferase [Townsend and Tew 2003; Zhang et al. 2001] ist ebenfalls als Chemoresistenzmechanismus beschrieben.

Zellen können sich der toxischen Wirkung eines Zytostatikums auch entziehen, ohne direkt auf das Zytostatikum einzuwirken. Ein Mechanismus ist die verstärkte Reparatur geschädigter DNA durch z.B. "*Nucleotide Excision Repair*" (NER) [Mukai et al. 2002; Park et al. 2002]. Ein anderer Mechanismus ist die Deregulation des Zellzyklus, z.B. durch die Überexpression von Zyklin D [Kornmann et al. 1999].

Eine weitere Strategie, durch die sich Tumorzellen der Wirkung von Zytostatika entziehen, sind Imbalancen von pro- und antiapoptotischen Molekülen, die zu einer verminderten apoptotischen Antwort (Apoptoseresistenz) führen [Morisaki and Katano 2003; Soengas and Lowe 2003]. In diesem Zusammenhang sind der Funktionsverlust des Tumorsuppressors p53 [Gasco and Crook 2003], die Hochregulation von antiapoptotischen Molekülen wie z.B. cIAP1, cIAP2, XIAP [Deveraux and Reed 1999] und die Herunterregulation von proapoptotischen Molekülen wie z.B. Bid [Erler et al. 2004] oder Smac/DIABLO [Mizutani et al. 2005] beschrieben worden.

Weiterhin ist die konstitutive Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in einen Zusammenhang mit der Apoptoseresistenz verschiedener Krebsarten gebracht worden [Schmid and Adler 2000; Wang et al. 1999]. Die Inhibition von NF- $\kappa$ B führt daher in vitro und in vivo zu einem besseren Ansprechen von Pankreaskarzinomzellen auf eine Chemotherapie [Arlt et al. 2001; Muerkoster et al. 2003].

Adhäsionsmoleküle können bei der Resistenzausprägung ebenfalls eine wichtige Rolle spielen [St Croix and Kerbel 1997]. Adhäsion sowohl an Komponenten der extrazellulären Matrix als auch an umliegende Zellen vermittelt Tumorzellen ein Überlebenssignal gegenüber physiologischen und chemotherapeutischen Apoptosemediatoren. Verschiedene Mechanismen können zu einer adhäsionsvermittelten Resistenz beitragen [Shain and Dalton 2001]. Dazu gehört eine reduzierte Zellproliferation, z.B. vermittelt durch den zyklinabhängigen Kinaseinhibitor p27<sup>Kip1</sup>, der durch interzelluläre Kontakte verstärkt exprimiert wird [St Croix et al. 1996]. Adhäsionsmoleküle scheinen zudem durch eine veränderte subzelluläre Verteilung der Zielstrukturen den zytotoxischen Effekt von Chemotherapeutika regulieren zu können [Shain and Dalton 2001].

Adhäsionsmoleküle können verschiedene Regulationspunkte der Apoptose angreifen. So schützt die Überexpression des “*Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 6*” (CEACAM6) Pankreasadenokarzinomzellen vor Gemcitabine-induzierter Apoptose, indem die Aktivierung der Caspase 3 gehemmt wird [Duxbury et al. 2004]. Zur Apoptoseresistenz führt als weiteres Beispiel auch die Hochregulation der antiapoptotischen Moleküle Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> durch Integrin-vermittelte Adhäsion in Leukämiezellen [de la Fuente et al. 2002; Matsunaga et al. 2003].

### **1.3. Verschiedene Formen von Zelltod**

Grundsätzlich werden mehrere Arten von Zelltod unterschieden, von denen Nekrose und Apoptose -als eine Form des programmierten Zelltodes- von besonderer Bedeutung sind [Broker et al. 2005].

Nekrose ist ein passiver Prozess, der durch externe Einflüsse wie hypoxische Zustände, physikalische oder chemische Traumen hervorgerufen wird und mehrere Zellen eines Gewebes gleichzeitig betrifft. Charakteristisch ist eine Volumenzunahme der Zelle, die in der Ruptur der Zellmembran resultiert. Durch die Freisetzung des intrazellulären Materials kommt es zu Entzündungserscheinungen in der Zellumgebung [Vermeulen et al. 2005].

Die Apoptose ist dagegen ein genetisch determinierter und daher kontrolliert ablaufender, physiologischer Prozess, dessen energiefordernde, intrazelluläre Maschinerie evolutionär hoch konserviert ist [Boyce et al. 2004]. Apoptose betrifft asynchron einzelne Zellen. Entzündungsreaktionen in der Umgebung bleiben typischerweise aus, da kein intrazelluläres Material aus den apoptotischen Zellen austritt [Vermeulen et al. 2005].

Im folgenden soll nur auf den apoptotischen Zelltod genauer eingegangen werden.

### **1.3.1. Bedeutung und charakteristische Merkmale der Apoptose**

Apoptose ist von großer Bedeutung für die Homöostase von Organen und Geweben sowie für die Morphogenese während der Embryonal- und Fetalphase. Es ist weiterhin ein notwendiger Prozess, um den lebenden Organismus vor infizierten, transformierten oder auf sonstige Weise geschädigten und damit potentiell schädlichen Zellen zu schützen [Vermeulen et al. 2005]. Fehlsteuerungen des Apoptoseprogramms sind beteiligt an verschiedenen Erkrankungen. Mit einer Reduktion der Apoptose hängen z.B. Erkrankungen wie Krebs, Xeroderma pigmentosum, Atherosklerose sowie Autoimmunerkrankungen (z.B. Systemischer Lupus Erythematodes) zusammen. Eine übermäßig gesteigerte Apoptose ist z.B. beteiligt an Infektionskrankheiten wie AIDS, neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson, aber auch an Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ I oder der Hashimoto-Thyreoditis sowie an vielen weiteren Erkrankungen. Deregulierte Apoptosemechanismen spielen außerdem eine Rolle bei der vorzeitigen Alterung, wie sie bei Progerie und Trisomie 21 (Down Syndrom) auftritt [Fadeel et al. 1999].

Apoptotische Zellen sind durch spezifische morphologische und biochemische Veränderungen charakterisiert. Die Zellmembran, deren Integrität zunächst erhalten bleibt, ist verschiedenen Veränderungen unterworfen. Es kommt zu charakteristischen Ausstülpungen (*“membrane blebbing“*) und zur Externalisierung von Phosphatidylserin, das sich in der gesunden Zelle auf der Membraninnenseite befindet und auf der Außenseite der apoptotischen Zelle als Phagozytosesignal dient [Savill and Fadok 2000; Vermeulen et al. 2005].

Weitere morphologische Charakteristika umfassen die Zellschrumpfung, die Kondensation des Chromatins und die Fragmentation der DNA. Die Zelle zerfällt schließlich in membranumgebene apoptotische Körperchen (*“apoptotic bodies“*), die von Phagozyten beseitigt werden [Vermeulen et al. 2005].

Die genannten morphologischen Veränderungen sind Resultate komplexer biochemischer Signalkaskaden, die im folgenden kurz dargestellt werden.

---

### 1.3.2. Molekulare Mechanismen der Apoptose-Signalwege

#### 1.3.2.1. Caspasen

Apoptotische Signalwege münden in der Aktivierung von Caspasen, die die zentralen Enzyme der Apoptose darstellen.

Caspasen sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat schneiden (*“Cysteiny-Aspartate-Cleaving Proteases“*).

Alle Caspasen werden als inaktive Zymogene (Procaspasen) synthetisiert, die aus einer N-terminalen Prodomäne gefolgt von einer großen und einer kleinen Untereinheit bestehen. Ihre Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung zwischen den beiden Untereinheiten, die zunächst ein Heterodimer und schließlich mit einem weiteren Heterodimer ein aktives Tetramer bilden.

Vierzehn verschiedene Caspasen sind zur Zeit bei Säugetieren identifiziert, von denen mindestens sieben eine Rolle bei der Apoptose spielen. Entsprechend ihrer Funktion während der Apoptose werden diese sieben Caspasen in zwei Gruppen unterteilt: in die Initiator-Caspasen, zu denen diejenigen mit einer langen Prodomäne gehören (Caspase 2, 8, 9 und 10) und in die Effektor-Caspasen, zu denen diejenigen mit einer kurzen Prodomäne gehören (Caspase 3, 6, und 7) [Riedl and Shi 2004].

Die Aktivierung von Initiator-Caspasen wird durch Polyproteinkomplexe vermittelt, für deren Bildung es zu einer Interaktion der Caspase-Prodomäne mit bestimmten Co-Faktoren kommt [Thornberry and Lazebnik 1998]. Die nachgeschalteten Effektor-Caspasen können sowohl durch aktive Initiator-Caspasen als auch autokatalytisch aktiviert werden. So wird z.B. die Procaspase 3 durch die aktiven Initiator-Caspasen 8 und 9, aber auch durch die aktive eigene Form gespalten und somit aktiviert [Kroemer and Martin 2005].

Einmal aktiviert, sind die Effektor-Caspasen verantwortlich für die proteolytische Spaltung einer Vielzahl von zellulären Proteinen wichtiger Signalwege (z.B. *“Poly-ADP-Ribose-Polymerase“* (PARP), *“Caspase Activated DNAase“* (CAD), Laminin). Deren Funktionsverlust führt zu den charakteristischen morphologischen und biochemischen Veränderungen während der Apoptose und unweigerlich zum Tod der Zelle [Riedl and Shi 2004].

Die Initiierung der Caspase-Kaskade kann je nach Induktionsart der Apoptosestimuli über mehrere Wege laufen. Hauptwege sind der extrinsische, Todesrezeptor-abhängige Signalweg und der intrinsische, mitochondriale Signalweg, die beide in Abbildung 1.1. vereinfacht dargestellt sind.

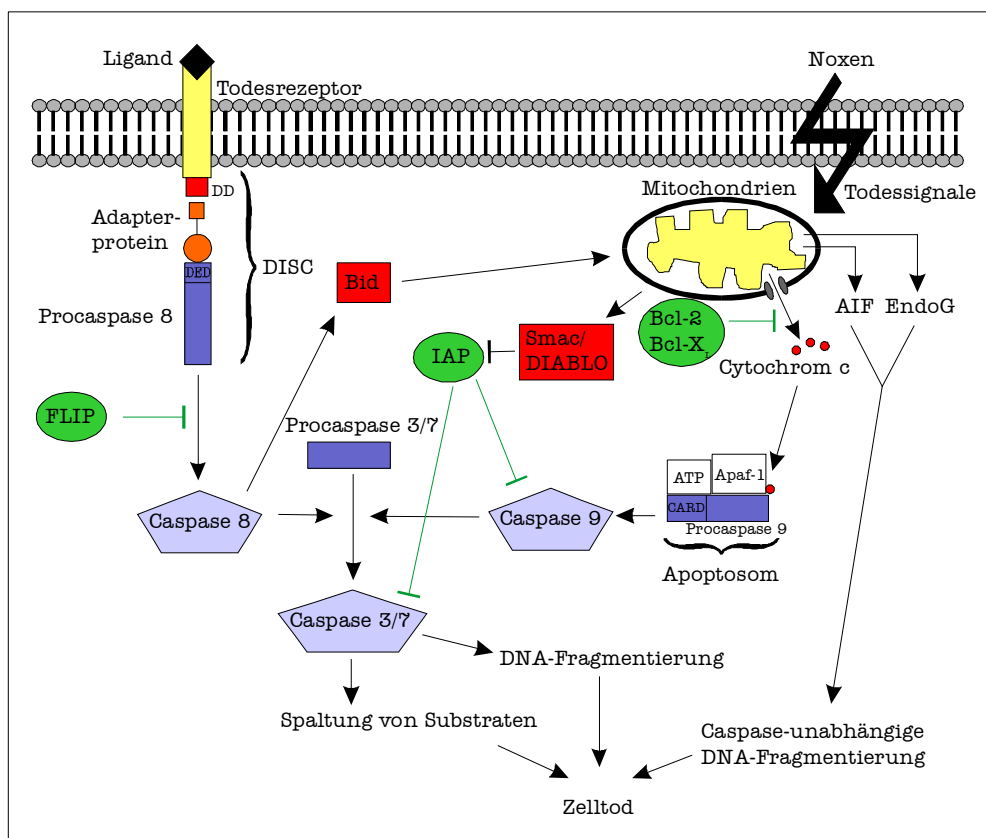


Abb. 1.1. Apoptose-Signalwege, vereinfacht dargestellt

### 1.3.2.2. Extrinsischer Signalweg

Externe Apoptosesignale werden über Todesliganden (*“Fas-Ligand“* (Fas-L), *“TNF-related Apoptosis-inducing Ligand“* (TRAIL), *“Tumor Necrosis Factor alpha“* (TNF $\alpha$ )) und deren membranständige Rezeptoren (Fas/CD95, TRAIL-Rezeptoren, TNF-Rezeptor) vermittelt. Nach erfolgter Ligation wird der zur Aktivierung der Initiator-Caspasen notwendige Polyproteinkomplex gebildet. Der *“Death-inducing Signaling Complex“* (DISC) entsteht durch Interaktion der *“Death Domain“* (DD) des Rezeptors mit der *“Death Effector Domain“* (DED) der Procaspase 8 unter Mithilfe des Adapterproteins *“Fas-associated Death Domain Protein“* (FADD) bzw. *“TNF-receptor-associated Death Domain Protein“* (TRADD) [Vermeulen et al. 2005]. Dieser Komplex kann durch Aktivierung der Caspase 8 auf zwei Wegen zum Tod der Zelle durch Apoptose führen. Aktive Caspase 8 spaltet und aktiviert zum einen direkt die Effektor-Caspasen 3 und 7 (Typ I Apoptose) und führt zum anderen über die Spaltung des Proteins Bid zur Aktivierung des intrinsischen, mitochondrialen Signalweges (Typ II Apoptose) [Kroemer and Martin 2005].

#### 1.3.2.3. Intrinsischer Signalweg

Interne Todessignale nach Noxen wie z.B. DNA-Schädigung durch Zytostatika, Wachstumsfaktorentzug oder Verlust des Kontaktes zur extrazellulären Matrix werden über Mitochondrien als zentrale Schaltstelle vermittelt. Die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran führt zur Freisetzung von apoptogenen Faktoren wie Cytochrom c. Im Zytosol führt die Interaktion von Cytochrom c mit dem Co-Faktor "*Apoptotic Protease Activating Factor-1*" (Apaf-1) sowie der "*Caspase Recruitment Domain*" (CARD) der Procaspase 9 im Beisein von ATP zur Bildung des Apoptosoms. Die durch diesen Polyproteinkomplex aktivierte Initiator-Caspase 9 aktiviert im folgenden die Effektor-Caspasen.

Zu weiteren mitochondrial freigesetzten Faktoren zählen Smac/DIABLO und Omi/HtrA2, die den inhibitorischen Effekt der "*Inhibitor of Apoptosis Family*" (IAP-Familie) antagonisieren und dadurch die Caspaseaktivität steigern. Weiterhin werden der "*Apoptosis Inducing Factor*" (AIF) und die Endonuklease G freigesetzt, die für eine Caspase-unabhängige DNA-Fragmentation verantwortlich sind [Gukovskaya and Pandol 2004].

Die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran wird u.a. gesteuert durch Proteine der Bcl-2-Familie, die durch wenigstens eine "*Bcl Homology*" (BH)-Domäne gekennzeichnet sind. Nach Apoptoseinduktion bilden proapoptotische Multidomänen-Mitglieder wie Bax und Bak porenähnliche Strukturen in der Mitochondrienmembran und stellen so eine Möglichkeit der Freisetzung von Cytochrom c dar. Proapoptotische Mitglieder mit nur einer BH-Domäne wie z.B. Bid triggern diesen Effekt. Bid, das durch Caspase 8 aktiviert wird, stellt dabei eine Verbindung zwischen dem Todesrezeptor-Apoptoseweg und dem mitochondrialen Apoptoseweg dar.

#### 1.3.2.4. Inhibitorische Regulation von Apoptose-Signalwegen

Zum Schutz der Zelle stehen Apoptose-Signalwege unter der Einwirkung einer Vielzahl von inhibitorischen Mechanismen, die ein unkontrolliertes Ablaufen der Caspasekaskade verhindern.

Als zentrale Enzyme der Apoptose unterliegen besonders Caspasen einer vielschichtigen Regulation ihrer Expression, ihres Abbaus, ihrer Aktivierung und ihrer Enzymaktivität.

Die Menge an Procaspasen wird zum einen transkriptional gesteuert [Riedl and Shi 2004] und zum anderen über den Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System reguliert [Friedman and Xue 2004].



Mitglieder der IAP-Familie (u.a. cIAP1, cIAP2 und XIAP) hemmen sowohl die Aktivierung der Caspasen als auch die enzymatische Aktivität der bereits aktivierten Caspasen 3, 7 und 9. Zusätzlich können Mitglieder der IAP-Familie Caspasen sowie deren Aktivatoren ubiquitinieren und dem proteasomalen Abbau zuführen [Friedman and Xue 2004]. IAP-Proteine können ihrerseits durch Smac/DIABLO, das bei Apoptoseinduktion aus den Mitochondrien freigesetzt werden kann, negativ reguliert werden [Riedl and Shi 2004].

Inhibitorische Effekte sowohl auf die Aktivierung als auch auf die Enzymaktivität bereits prozessierter Caspasen üben noch einige andere Faktoren aus, zu denen z.B. Stickstoffmonoxid (NO) gehört, das Caspasen durch Nitrosylierung inaktivieren kann [Earnshaw et al. 1999].

Antiapoptotische Wirkung haben zudem weitere Regulatoren, die an anderen Punkten der Apoptose-Signalwege eingreifen und so indirekt Einfluss auf die Caspasen nehmen.

Endogene Inhibitoren des Todesrezeptor-abhängigen Signalweges sind Proteine, die zu der Familie der *“FADD-like Interleukin 1 Converting Enzyme (ICE) Inhibitory Proteins“* (FLIP) gehören. Sie verhindern die Einbindung der Initiator-Caspasen in den DISC und damit die Aktivierung der Caspase-Kaskade [Vermeulen et al. 2005]. Antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie wie Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> verhindern auf verschiedenen Wegen die Cytochrom c Freisetzung und unterbrechen so die Signalkaskade des intrinsischen Weges [Debatin 2004].

Bei der Regulation von Apoptose spielen Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle eine wichtige Rolle, hervorzuheben ist hier der *“Nuclear Factor kappa B“* (NF-κB). Der Transkriptionsfaktor NF-κB ist ubiquitär verbreitet und in eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen involviert. So kann NF-κB durch transkriptionelle Induktion von Genen mit apoptoseinhibierender Wirkung Einfluss auf die Regulation des zellulären Überlebens nehmen. NF-κB reguliert u.a. die Expression der Apoptoseinhibitoren cIAP1, cIAP2, Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> sowie des Caspase-8-Inhibitors FLIP.

#### 1.3.2.5. Aktivierung von Apoptose-Signalwegen durch Zytostatika

Zytostatika-induzierter Zelltod basiert überwiegend auf der Induktion von Apoptose in den Zielzellen. Die Initiation kann sowohl über den Rezeptor-abhängigen als auch über den mitochondrialen Signalweg erfolgen. Die relative Beteiligung der verschiedenen Mechanismen variiert dabei abhängig von der Art des zytotoxischen Stimulus sowie des Tumorzelltyps. Die meisten Zytostatika induzieren Apoptose über den mitochondrialen Signalweg durch Aktivierung von Caspase 9. Einige Zytostatika, z.B. Etoposid, können in Tumorzellen jedoch auch über eine Aktivierung der Caspase 8 zur Apoptose führen [Debatin 2004; Debatin and Kramer 2004].

---

#### **1.4. Ziel dieser Arbeit**

Einer erfolgreichen Therapie des duktaalen Pankreasadenokarzinoms steht in der überwiegenden Zahl der Fälle die von vornherein bestehende oder im Therapieverlauf erworbene Chemoresistenz der Karzinomzellen entgegen. Die Aufklärung der zugrunde liegenden Resistenzmechanismen kann zu neuen Möglichkeiten führen, die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber Zytostatika entscheidend zu verstärken.

Ziel dieser Arbeit war es, Einblicke in die Bedeutung von Tumor-Stroma-Interaktionen bei der Entstehung und Manifestation von Chemoresistenz in Pankreaskarzinomzellen zu erhalten. In einem mehrwöchigen Co-Kulturmodell in vitro sowie in einem SCID-Maus-Modell in vivo -jeweils bestehend aus der humanen Pankreaskarzinomzelllinie Panc89 und murinen Pankreasfibroblasten- sollten dafür folgende Punkte untersucht werden:

##### a) in vitro

- Sensitivität der mono- und kokultivierten Panc89-Zellen gegenüber einer Zytostatikabehandlung mit Etoposid
- Fähigkeit der Panc89-Zellen, einen resistenten Phänotyp auch nach Ende der Co-Kultur zu erhalten
- NF- $\kappa$ B Status der mono- und kokultivierten Panc89-Zellen
- Sekretion des Zytokins IL1 $\beta$  in mono- und kokultivierten Panc89-Zellen
- Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 in mono- und kokultivierten Panc89-Zellen
- Aktivierung der Caspasen 8, 9, 3 und 7 in mono- und kokultivierten Panc89-Zellen nach Behandlung mit Etoposid
- mögliche Regulationsmechanismen für die Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 in mono- und kokultivierten Panc89-Zellen

##### b) in vivo

- Wachstum der Mono- und Co-Tumore
- Ansprechrate der Mono- und Co-Tumore auf Etoposid anhand von Tumolvolumen und immunhistologischer Apoptose-Färbungen (TUNEL)
- Epithelialer und stromaler Anteil der Mono- und Co-Tumore anhand immunhistologischer Färbungen (Pan-Cytokeratin und " *$\alpha$ -Smooth Muscle Actin*" ( $\alpha$ -SMA))
- Proliferation der Mono- und Co-Tumore anhand immunhistologischer Färbungen (Ki67)
- Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 in den Mono- und Co-Tumoren anhand immunhistologischer Färbungen

---

## **2. Materialien und Geräte**

### **2.1. Zellen und Zelllinien**

- Murine Pankreasfibroblasten
- Pankreasadenokarzinom-Zelllinie Panc89 (Synonym T3M4)

### **2.2. Materialien und Geräte für die Isolierung und Expansion von murinen**

#### **Pankreasfibroblasten**

- 10mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie, München)
- 1ml-Spritzen (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Besteck: Pinzette, Schere, Skalpell
- CO<sub>2</sub>
- Kanülen (Sterican Gr.17: 0,55x25mm BL/LB 24gauge) (Becton Dickinson, Heidelberg)
- “*Phosphate Buffered Saline*“ (PBS), steril (PAA Laboratories, Cölbe)
- “*Soy Bean Trypsin Inhibitor*“ (SBTI) (Sigma-Aldrich Chemie, München)
- Zellkultur-Petrischalen mit einem Durchmesser von 10cm (Sarstedt, Nümbrecht)
- Zellsieb Nylon, 100µm Porengröße (Becton Dickinson, Heidelberg)

### **2.3. Zellkultur**

#### **2.3.1. Medien und Medienzusätze**

- DMEM low glucose Medium (PAA Laboratories, Cölbe)
- Fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom AG, Berlin)
- Gentamicin (Konzentration 100µg/ml, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)
- HEPES-Puffer 1M (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)
- L-Glutamin (Konzentration 200mM, PAA Laboratories, Cölbe)
- Penicillin-Streptomycin (Konzentration 100U/ml bzw. 100µg/ml, Biochrom AG, Berlin)
- RPMI 1640 Medium (PAA Laboratories, Cölbe)

#### **2.3.2. Sonstige Materialien und Geräte für die Zellkultur**

- 1x Trypsin/EDTA in PBS (0,5g/l Trypsin und 0,2g EDTA/l) (PAA Laboratories, Cölbe)
- 50ml und 15ml Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht)
- 70% Ethanol, vergällt (Walter, Kiel)

- Brutschrank (Kendro, Langenselbold)
- Einmal-Pipetten 5ml, 10ml, 25ml (Sarstedt, Nümbrecht)
- Gasbrenner (Integra Biosciences, Schweiz)
- Mikroskop Axiovert 25 (Zeiss, Jena)
- Pasteurpipetten Glas, 230mm (Assistent, Sondheim)
- Pipet-Boy (Integra Biosciences, Schweiz)
- Saugpumpe
- Sixwell-Platten (Nunc, Wiesbaden oder Corning Costar, Bodenheim)
- Sterilbank (Kendro, Langenselbold)
- Transwelleinsätze: Transwell Clear Polyester Membrane, 24mm Durchmesser, 0,4µm Porengröße (Corning Costar, Bodenheim)
- Zellkulturflaschen 75cm<sup>2</sup> (Sarstedt, Nümbrecht)
- Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht)
- Zentrifuge (Kendro, Langenselbold)

#### **2.4. Substanzen für die Behandlung der Zellen**

- Etoposid (Bristol-Myers Squibb, München)
- MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 (Calbiochem, Bad Soden)
- DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin (Sigma-Aldrich Chemie, München)
- Proteasominhibitor MG132 (Calbiochem, Bad Soden)

#### **2.5. Materialien und Geräte für die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie**

- 1x Annexin V Binding Puffer (Becton Dickinson, Heidelberg)
- 1x Trypsin/EDTA in PBS (0,5g/l Trypsin und 0,2g EDTA/l) (PAA Laboratories, Cölbe)
- Annexin V-FITC (Caltag Laboratories, Hamburg oder Becton Dickinson, Heidelberg)
- Dead Cell Discriminator (Propidiumiodid) (Caltag Laboratories, Hamburg)
- Durchflusszytometer GalaxyArgon Plus (DakoCytomation, Hamburg)  
Software Flomax (DakoCytomation, Hamburg)
- PBS (PAA Laboratories, Cölbe)
- Sheath Puffer (DakoCytomation, Hamburg)
- Zentrifuge (Kendro, Langenselbold)

---

## **2.6. Materialien und Geräte für die Proteingewinnung**

### **2.6.1. Materialien und Geräte für die Herstellung von Kernextrakten**

- Aprotinin (Sigma-Aldrich Chemie, München)
- DTT (Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg)
- EDTA (Sigma-Aldrich Chemie, München)
- Hepes-Puffer 1M (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe)
- Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt)
- Minishaker (IKA Works, Staufen)
- Natriumchlorid (Mallinckrodt Baker, Niederlande)
- PBS (PAA Laboratories, Cölbe)
- PMSF (Sigma-Aldrich Chemie, München)
- Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht)
- Zentrifuge (Kendro, Langenselbold)

### **2.6.2. Materialien und Geräte für die Herstellung von Ganzzelllysaten**

- Glycerol (Sigma-Aldrich Chemie, München)
- SDS (Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg)
- Sonicator Sonopuls (Bandelin, Berlin)
- Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg)
- Tris Base (Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg)
- Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht)

## **2.7. Materialien und Geräte für die Proteinbestimmung**

- DC-Protein-Assay (Bio-Rad Laboratories, München)
- Microtest Plate 96-well (Sarstedt, Nümbrecht)
- Photometer: Opsys MR (Dynex Technologies, USA)  
Software: Revelation QuickLink

---

**2.8. Materialien und Geräte für die SDS-Gelelektrophorese und Western Blotting**

- 10% Ammoniumpersulfat in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (Sigma-Aldrich Chemie, München)
- 100% Methanol (Merck, Darmstadt)
- 40% Acrylamid 4x cryst. (Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg)
- 6-Aminocapronsäure (Sigma-Aldrich Chemie, München)
- β-Mercaptoethanol (Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg)
- Blotkammer: Fastblot (Biometra, Göttingen)
- Bromphenolblau (Serva, Heidelberg)
- BSA (Serva, Heidelberg)
- ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)  
Software: Quantity One
- Fertiggele: ProGel-Tris-Glycin-Gel 4-20% (Anamed, Darmstadt)
- Gelkammer für Fertiggele: XCell SureLock (Invitrogen, Karlsruhe)
- Gelkammer für selbstgegossene Gele (Biometra, Göttingen)
- Glycin (Merck, Darmstadt)
- Immobilon-PVDF Transfer Membran (Millipore, USA)
- LumiGlo Lösung (Cell Signaling, Frankfurt am Main)
- Magermilchpulver (Roth, Karlsruhe)
- Natriumchlorid (Mallinckrodt Baker, Niederlande)
- Netzgerät: Standard Power Pack P25 (Biometra, Göttingen)
- Proteinmarker: MultiMark Multi-Colored Standard 1x (Invitrogen, Karlsruhe)
- Proteinmarker: Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Schüttler: Tumbling Table (Biometra, Göttingen)
- SDS (Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg)
- SuperSignal West Dura (Pierce Perbio Science, Bonn)
- TEMED (Sigma-Aldrich Chemie, München)
- Tris Base (Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich Chemie, München)
- Whatman Filterpapier (Biometra, Göttingen)

## **2.9. Antikörper für Western Blotting**

### **2.9.1. Primärantikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies/Isotyp (Klon)</b>	<b>Bezugsquelle</b>
anti- $\alpha$ -Tubulin	Maus monoklonal (B-5-1-2)	Sigma-Aldrich Chemie, München
anti-Caspase 3	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt am Main
anti-Caspase 7	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt am Main
anti-Caspase 8	Maus IgG1 monoklonal (1C12)	Cell Signaling, Frankfurt am Main
anti-Caspase 9	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt am Main
anti-cIAP-1	Ziege IgG polyklonal	R&D Systems, Wiesbaden
anti-cIAP-2	Kaninchen polyklonal	Chemicon, Hofheim
anti-cleaved Caspase 3 (Asp175)	Kaninchen monoklonal (5A1)	Cell Signaling, Frankfurt am Main
anti-cleaved Caspase 9 (Asp315)	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt am Main
anti-Hsp 90 $\alpha/\beta$	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg
anti-L1CAM / CD171	Maus IgG1 monoklonal (UJ127)	Acris, Hiddenhausen
anti-Phospho-p44/42 Map-Kinase (Erk1/Erk2) (Thr202/Tyr204)	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt am Main
anti-XIAP	Ziege IgG polyklonal	R&D Systems, Wiesbaden

### **2.9.2. Sekundärantikörper**

<b>Antikörper-Konjugat</b>	<b>Spezies/Isotyp</b>	<b>Bezugsquelle</b>
anti-Kaninchen-HRP	Ziege IgG polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt am Main
anti-Maus-HRP	Pferd IgG polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt am Main
anti-Ziege-HRP	Esel IgG polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg

## **2.10. Materialien und Geräte für die RNA-Isolierung**

- 100% und 70% Ethanol (Merck, Darmstadt)
- $\beta$ -Mercaptoethanol (Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg)
- PBS (PAA Laboratories, Cölbe)
- Photometer GeneQuant II (Pharmacia Biotech, Freiburg)
- QIAshredder (Qiagen, Hilden)
- RNeasy Mini-Kit (Qiagen, Hilden)
- Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht)
- Zentrifuge (Kendro, Langenselbold)

---

**2.11. Materialien und Geräte für die Herstellung von cDNA**

- Brutschrank (Kendro, Langenselbold)
- dATP (10mM) (Roche Applied Biosystems, Weiterstadt)
- dCTP (10mM) (Roche Applied Biosystems, Weiterstadt)
- dGTP (10mM) (Roche Applied Biosystems, Weiterstadt)
- dTTP (10mM) (Roche Applied Biosystems, Weiterstadt)
- Minishaker (IKA Works, Staufen)
- M-MLV-5x First Strand Buffer (Invitrogen, Karlsruhe)
- M-MLV-Reverse Transkriptase (200U/μl) (Invitrogen, Karlsruhe)
- Oligo(dT) 15 Primer (500μg/ml) (Promega, Mannheim)
- Ribonuklease-freies Wasser (Qiagen, Hilden)
- RNasin RNase Inhibitor (40U/μl) (Promega, Mannheim)
- Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg)
- Tischzentrifuge PicoFuge (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)

**2.12. Materialien und Geräte für die Realtime-PCR**

- 96well PCR-Platten (Corning Costar, Bodenheim)
- Adhesive PCR Film Clear (Abgene, Hamburg)
- iCycler MyiQ Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)  
Software: MyiQ
- Primer:
  - β-Aktin (BD Biosciences Clontech, Heidelberg)  
Vorwärtsprimer 3': CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC  
Rückwärtsprimer 5': ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG
  - Caspase 3 Primer-Mix (Maxim Biotech Inc./Biozol Diagnostica Vertrieb, Eching)  
Vorwärtsprimer 3': TGCCACAGTCCAGTTCTGTACC  
Rückwärtsprimer 5': TGGTACAGATGTCGATGCAGC
  - Caspase 7 Primer-Mix (Maxim Biotech Inc./Biozol Diagnostica Vertrieb, Eching)  
Vorwärtsprimer 3': CATCTTTGTCTGTTCCGTTTCGAAC  
Rückwärtsprimer 5': CTACCGCCGTGGGAACGATG
  - Caspase 8 Primer-Mix (Maxim Biotech Inc./Biozol Diagnostica Vertrieb, Eching)  
Vorwärtsprimer 3': TGTGAAAGTAGGCTGAGGCATCTG  
Rückwärtsprimer 5': TGAGCTGACATCTCAGTTCACTGT



- 
- Caspase 9 Primer-Mix (Maxim Biotech Inc./Biozol Diagnostica Vertrieb, Eching)  
Vorwärtsprimer 3': CTGGCTCGGGGTTACTGCCAG  
Rückwärtsprimer 5': GGCTGTCTACGGCACAGATGG
  - Ribonuklease-freies Wasser (Qiagen, Hilden)
  - SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

### **2.13. Materialien und Geräte für ELISA**

- 1x Trypsin/EDTA in PBS (0,5g/l Trypsin und 0,2g EDTA/l) (PAA Laboratories, Cölbe)
- Neubauer Zählkammer (0,1mm Tiefe) (Omnilab, Hamburg)
- Mikroskop Axiovert 25 (Zeiss, Jena)
- Quantikine High Sensitivity human IL1 $\beta$  (R&D Systems, Wiesbaden)
- TransAM NF- $\kappa$ B ELISA (Active Motif, Belgien)
- Photometer: Opsys MR (Dynex Technologies, USA)  
Software: Revelation QuickLink

### **2.14. Materialien und Geräte für die Tierhaltung**

- Einstreu (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest)
- Fertigfutter (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest)
- Standardkäfige Typ 3 Makrolon (E. Becker & Co GmbH, Castrop-Rauxel) mit Innenausstattung: Plastikhaus, Papprolle, Zellstoff
- Tierwaage
- Trinkwasser

### **2.15. Materialien und Substanzen für die Behandlung der Tiere sowie für die Organentnahme**

- CO<sub>2</sub>
- Diethylether (Fluka Chemie, Buchs, Schweiz)
- Einmalrasierer
- Etoposid (Bristol-Myers Squibb, München)
- Flüssigstickstoff (Messer Griesheim GmbH, Krefeld)
- Instrumente: Pinzette, Schere, Ohrstanze zur Markierung
- Insulinspritzen (Becton Dickinson, Heidelberg)
- NaCl-Lösung 0,9%, steril (Braun, Melsungen)

## **2.16. Materialien und Geräte für die Immunzytologie und Immunhistologie**

- Aceton (Merck, Darmstadt)
- Biotin Blocking System (DakoCytomation, Hamburg)
- BSA (Serva, Heidelberg)
- Deckgläschen (Menzel Gläser, Braunschweig)
- Einbettmedium (Leica, Bensheim)
- Feuchtkammer
- Glasfärbeküvetten
- Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt)
- Mayers Hämlaunlösung (Merck, Darmstadt)
- Mikroskop Axiophot 2 (Carl Zeiss, Jena)  
Kamera: AxioCam (Carl Zeiss, Jena)  
Software: Axiovision (Carl Zeiss, Jena)
- Mikrotom: Cryocut 1800 (Leica, Bensheim)
- PBS (PAA Laboratories, Cölbe)
- sterilisierte, runde Deckgläschen (Menzel Gläser, Braunschweig)
- SuperFrost Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemie, München)
- Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt)

## **2.17. Antikörper und Detektionssysteme für die Immunzytologie und Immunhistologie**

### **2.17.1. Primärantikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies/Isotyp (Klon)</b>	<b>Bezugsquelle</b>
anti-Caspase 3	Ziege polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg
anti-Caspase 7	Ziege polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg
anti-Caspase 8	Maus monoklonal (1C12)	Cell Signaling, Frankfurt am Main
anti-Caspase 9	Kaninchen polyklonal	Cell Signaling, Frankfurt am Main
anti-Cytokeratin (pan)	Maus monoklonal (Lu-5)	BMA Biomedicals, Schweiz
anti-Desmin	Kaninchen polyklonal	Sigma-Aldrich Chemie, München
anti-Ki67	Maus Monoklonal (B56)	BD-Pharmingen, Heidelberg
anti-Vimentin	Ziege polyklonal	Sigma-Aldrich Chemie, München
anti- $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin	Maus monoklonal (1A4)	Sigma-Aldrich Chemie, München
In Situ Cell Death Detection Kit, POD (TUNEL-Kit)		Roche Applied Biosystems, Weiterstadt

---

### 2.17.2. Sekundärantikörper und immunhistologische Detektionssysteme

<b>Sekundärantikörper und Detektionssysteme</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Biotin-SP-konjugiertes Esel Anti-Ziege IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories über Dianova, Hamburg
Biotin-SP-konjugiertes Ziege Anti-Kaninchen IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories über Dianova, Hamburg
EnVision System Anti-Maus	DakoCytomation, Hamburg
EnVision System Anti-Kaninchen	DakoCytomation, Hamburg
Peroxidase-konjugiertes Streptavidin	Jackson ImmunoResearch Laboratories über Dianova, Hamburg
Peroxidase-konjugiertes Esel Anti-Maus IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories über Dianova, Hamburg
Peroxidase-konjugiertes Ziege Anti-Ratte IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories über Dianova, Hamburg
Peroxidase Substrat Kit DAB	Vector Laboratories über Alexis, Grünwald

### **3. Methoden**

#### **3.1. Isolierung und Expansion von murinen Pankreasfibroblasten**

Für die Co-Kulturexperimente in vitro und in vivo wurden als Stromakomponente murine Pankreasfibroblasten verwendet. Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen aus den Pankreata von weiblichen SCID-Mäusen, Stamm C.B-17/IcrHsd-scid (Harlan-Winkelmann, Borcheln) isoliert.

Die Tiere wurden mit CO<sub>2</sub> betäubt und anschließend durch Genickbruch getötet. Aus dem Herz der Mäuse wurde zur Gewinnung von Serum Blut mit Hilfe von 1ml Spritzen und 24gauge Kanülen abgenommen. Es folgte die Entnahme des Pankreas, welches in sterilem PBS mit 2µM des Trypsininhibitors SBTI auf Eis aufbewahrt wurde.

Das Pankreas wurde mit Hilfe eines Skalpell an einer Sterilbank in Stücke mit einer Maximalgröße von 2x2x2 mm zerteilt. In einer Kulturpetrischale wurden zur Befestigung und als Migrationsstimulus pro Gewebeteil je 1µl Mausserum und 1µl 10mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung zu einem Tropfen gemischt. Nach Aufbringen der Pankreasstücke musste eine Koagulationszeit von 30 Minuten abgewartet werden, ehe in jede Schale 10ml Medium gegeben wurden. Als Medium wurde DMEM low glucose verwendet, das mit 1% L-Glutamin, 20% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin, 0,2% Gentamicin und 1% Hepes-Puffer versetzt wurde. Die Gewebestücke wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 85% Feuchtigkeit in Kultur gehalten; ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Die beschriebene Art der Aufarbeitung und die genannten Kulturbedingungen ermöglichten eine hoch selektive Expansion von Pankreasfibroblasten.

Eine ausreichende Migration von Fibroblasten war nach etwa drei Wochen erreicht, so dass die Zellen zu diesem Zeitpunkt mit 5ml 1x Trypsin/EDTA in PBS pro Petrischale und unter Zuhilfenahme eines Zellschabers vom Untergrund abgelöst wurden. Die noch vorhandenen Gewebestücke wurden mit einem Zellsieb ausgefiltert. Nach zehnminütiger Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. 5x10<sup>5</sup> Fibroblasten wurden in eine Zellkulturflasche mit 10 ml Medium gegeben. Abhängig vom Wachstum der Zellen wurde für die weitere Kultivierung das oben beschriebene Medium mit einem FCS-Gehalt von 10% benutzt.

Bevor die gewonnenen Fibroblasten für weitere Versuche verwendet worden sind, wurde durch eine immunzytologische Färbung auf α-SMA, Vimentin und Desmin der myofibroblastische Phänotyp der Zellen überprüft (siehe Punkt 3.9.1.).

---

## **3.2. Zellkultur**

### **3.2.1. Mono-Kultivierung von humanen Panc89-Zellen und murinen**

#### **Pankreasfibroblasten**

Die Zelllinie Panc89 (Synonym T3M4) ist eine adhärent wachsende Pankreaskarzinomzelllinie, die aus einer Lymphknotenmetastase eines duktales Pankreasadenokarzinoms eines 64jährigen Patienten isoliert worden ist [Monti et al. 2004].

Diese Tumorzelllinie wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H. Kalthoff (Forschungsgruppe Molekulare Onkologie, Klinik für Allgemeine und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel) zur Verfügung gestellt.

Diese humanen Pankreaskarzinomzellen sowie die murinen Pankreasfibroblasten wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 85% Feuchtigkeit in Kultur gehalten.

Die Panc89-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium supplementiert mit 1% L-Glutamin und 10% FCS kultiviert.

Als Medium für die murinen Fibroblasten wurde DMEM low glucose verwendet, das mit 1% L-Glutamin, 10% oder 20% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin, 0,2 % Gentamicin und 1% Hepes-Puffer versetzt wurde.

Grundsätzlich fanden alle Zellkulturarbeiten an einer Sterilbank statt. Die Zellen wurden bei Erreichen einer ca. 80%igen Konfluenz des Zellrasens entsprechend ihrer Wachstumsrate geteilt. Bei dieser Passagierung wurde das verbrauchte Medium in den Zellkulturflaschen mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellen zur Ablösung mit 1x Trypsin/EDTA in PBS überschichtet. Der Lysevorgang wurde nach ca. 10 Minuten durch die Zugabe von Medium im Verhältnis 1:1 zum Trypsinvolumen abgestoppt. Die entstandene Zellsuspension wurde bei 1200 Umdrehungen pro Minute (U/min) für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in frischem Medium aufgenommen und auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt.

### **3.2.2. Co-Kultivierung von humanen Panc89-Zellen und murinen**

#### **Pankreasfibroblasten, Generierung von „Mono-aus-Co“ (MaC)-Zellen**

Der Speziesunterschied zwischen Tumorkomponente (human) und Stromakomponente (murin) ermöglichte eine differenzierte Aussage hinsichtlich der Herkunft aller löslichen Faktoren.

Zur Untersuchung von Tumor-Stroma-Interaktionen wurde für diese Arbeit ein Transwellsystem gewählt, das einen Zell-Zell-Kontakt der beiden Komponenten nicht

ermöglichte, wohl aber den Austausch von löslichen Faktoren durch Mikroporen in der Membran des Transwell-Einsatzes (siehe Abbildung 3.1.).

Durch diese Art der Kultivierung konnten Tumor- und Stromazellen getrennt aufgearbeitet und analysiert werden.

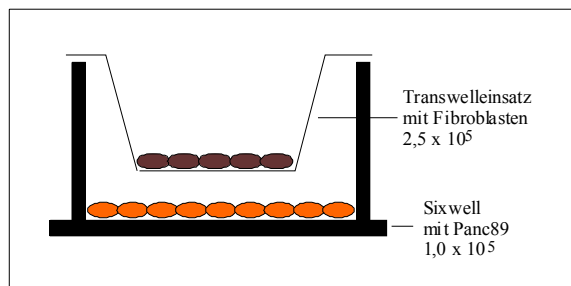


Abb. 3.1. *Prinzip der Co-Kultur*

Zur Co-Kultivierung wurden Sixwell-Platten und die genannten Transwelleinsätze verwendet. In die Sixwell-Platte, die das untere Kompartiment des Co-Kultursystems darstellte, wurden  $1 \times 10^5$  Panc89-Zellen in 2,0ml Tumorzellmedium pro well ausgesät. In die eingesetzten Transwells wurden je  $2,5 \times 10^5$  murine Fibroblasten in 1,5ml Fibroblastenmedium eingebracht. Das Medium in beiden Kompartimenten wurde nach 24 Stunden gewechselt und die Co-Kultur entweder für weitere 72 Stunden fortgesetzt und für Versuche verwendet oder zur Weiterkultivierung genutzt. Zur Weiterkultivierung wurden einerseits die Fibroblasten aus dem oberen und andererseits die Tumorzellen aus dem unteren Kompartiment mittels Trypsin/EDTA in PBS abgelöst, in Medium aufgenommen, zentrifugiert, in Medium resuspendiert, gezählt und wie oben beschrieben erneut ausgesät.

Die Co-Tumorzellen sowie die Co-Fibroblasten befanden sich demnach über einen längeren Zeitraum kontinuierlich in diesem Transwell-Co-Kultursystem, in dem sie einmal wöchentlich für Versuche ausgesät und zur Weiterkultivierung passagiert wurden.

Zusätzlich wurden jede Woche Tumorzellen aus der Co-Kultur entnommen und wieder ohne Fibroblasten monokultiviert. Auf diese Weise entstanden jede Woche sogenannte „Mono-aus-Co-Zellen“ (MaC-Zellen), die von mindestens einer Woche an aufwärts unterschiedlich lange cokultiviert wurden, bevor sie wieder ohne Fibroblasten für eine Woche monokultiviert worden sind. Mac-Zellen z.B. der Woche zwei verbrachten somit eine Woche in Co-Kultur und im Anschluss wieder eine Woche in Mono-Kultur, solche der Woche vier drei Wochen in Co-Kultur und eine Woche in Monokultur. Anhand dieser Zellen sollte geklärt werden, ob sich die durch die Co-Kultur gewonnenen Eigenschaften auch über diese hinaus erhielten. Für die Versuche wurden MaC-Zellen in Sixwell-Platten mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$

Zellen pro well in einem Gemisch aus 2,0ml Tumorzellmedium und 1,5ml Fibroblastenmedium ausgesät.

Die Mono-Tumorzellen und die Mono-Fibroblasten wurden über die Dauer der parallel laufenden Co-Kultur weiter in Zellkulturflaschen gehalten, so dass die in den Versuchen gegenübergestellten Mono-, Co- und MaC-Tumorzellen eine identische Zeitspanne in Kultur waren.

Zum Vergleich zu den Co- und MaC-Zellen wurden bei den Versuchen monokultivierte Tumorzellen in Sixwell-Platten mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen pro well in einem Gemisch aus 2,0ml Tumorzellmedium und 1,5ml Fibroblastenmedium ausgesät.

### **3.3. Messung der Apoptoserate mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie**

#### **3.3.1. Prinzip der Methode**

Die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie ermöglicht eine Analyse der physikalischen und molekularen Eigenschaften von einzelnen Zellen in einer Suspension.

Das Prinzip basiert auf optischen Signalen, die die Zellen als Streulicht aussenden, wenn sie einzeln einen Laserstrahl passieren. Eigenschaften wie Größe und Granularität der Zellen beeinflussen dabei den Streuwinkel des Lichtes. Man unterscheidet das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter = FSC), das mit der Zellgröße korreliert und das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter = SSC), das mit der Granularität der Zelle korreliert. Ferner können Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Trifft der Laserstrahl auf diese markierten Zellen, werden neben dem Streulicht auch Fluoreszenzsignale erzeugt, indem die gebundenen Farbstoffe angeregt werden, Licht ihrer spezifischen Wellenlänge zu emittieren. Durch Spiegel- und Filtersysteme werden sowohl das Streulicht als auch das emittierte Licht verstärkt und je nach Streuwinkel bzw. Wellenlänge auf verschiedene Lichtsensoren gelenkt.

Zur Bestimmung der Apoptoserate werden die Zellen mit Annexin V, an das der Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt ist, und mit Propidiumiodid (PI) angefärbt. Zellen, die sich im Prozess der Apoptose befinden, externalisieren Phosphatidylserin. An dieses bindet das Annexin V-FITC, so dass apoptotische Zellen durch diesen Farbstoff markiert werden. In der frühapoptotischen Phase besteht noch eine intakte Zellmembran, so dass eine zusätzliche Färbung mit dem interkalierenden Farbstoff PI nicht stattfinden kann. Im spätapoptotischen Stadium ist die Integrität der Membran nicht mehr gegeben, so dass die Zelle nun sowohl durch Annexin V-FITC als auch durch PI markiert wird. Nekrotische Zellen werden nur durch PI gefärbt.

---

### **3.3.2. Durchführung**

Die Zellen wurden ausgesät und kultiviert wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben.

Das Medium in allen wells wurde nach 24 Stunden gewechselt. Nach weiteren 48 Stunden blieben die Zellen unbehandelt oder wurden mit 20µg/ml Etoposid behandelt. Die Aufarbeitung erfolgte weitere 24 Stunden später.

Zusätzlich wurden bei einigen Versuchen folgende Substanzen in der angegebenen Endkonzentration einzeln verwendet:

- 1µM 5-Azacytidin direkt nach dem Mediumwechsel und eine Stunde vor der Behandlung mit Etoposid
- 50µM MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 eine Stunde vor der Behandlung mit Etoposid

Nachdem das Medium aus den wells in 15ml Röhrchen pipettiert worden war, wurden die Tumorzellen mit 1x Trypsin/EDTA in PBS von ihrer Unterlage gelöst und zu ihrem Medium in das entsprechende Röhrchen gegeben. Die Zellsuspension wurde bei 1350 U/min 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen, das Zellpellet mit 5 ml PBS gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde jede Probe mit einem zuvor angesetzten Gemisch aus 200µl 1x Annexin V Binding Puffer, 5µl Annexin V-FITC und 5µl Propidiumiodid resuspendiert. Nach einer anschließenden 20minütigen Inkubationszeit (lichtgeschützt und bei Raumtemperatur) erfolgte die Analyse per Fluoreszenz-Durchflusszytometrie mit dem GalaxyArgon Plus unter Gebrauch der Flomax Software.

## **3.4. Proteintechniken**

### **3.4.1. Proteingewinnung**

#### **3.4.1.1. Herstellung von Kernextrakten**

Kernextrakte wurden für die semiquantitative Bestimmung von aktiviertem NF-κB mittels ELISA benötigt.

Die Zellen wurden ausgesät und kultiviert wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben.

Das Medium in allen wells wurde nach 24 Stunden gewechselt. Nach weiteren 72 Stunden wurde das Medium verworfen und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen. Für die folgenden Schritte wurden die Reagenzien und Gefäße durchgehend auf Eis aufbewahrt. Die Zellen wurden mit 200µl EMSA-Puffer I pro well lysiert, mittels eines Zellschabers vom



Boden der wells gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Diese wurden bei 4°C mit 13.000 U/min 5 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 200µl EMSA-Puffer I resuspendiert und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nachdem der Überstand wiederum verworfen worden war, wurde das Pellet mit 50-80 µl EMSA-Puffer II gemischt und für 25 Minuten bei 4°C in einen Minishaker gestellt. Nach der abschließenden zehnminütigen Zentrifugation bei 4°C und 13.000 U/min wurde der Überstand, in dem nun durch die beschriebene Aufarbeitung die nukleären Proteine enthalten waren, abgenommen und bei -80°C eingefroren.

#### Pufferzusammensetzung

EMSA-Puffer I	EMSA-Puffer II
10mM Hepes-Puffer pH 7,9 10mM Kaliumchlorid 0,2mM EDTA pH 8,0 1mM DTT 0,5mM PMSF H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> 10µg Aprotinin pro ml Puffer vor Gebrauch frisch dazugeben	10mM Hepes-Puffer pH 7,9 0,4mM Natriumchlorid 0,2mM EDTA pH 8,0 1mM DTT 0,5mM PMSF H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> 10µg Aprotinin pro ml Puffer vor Gebrauch frisch dazugeben

#### 3.4.1.2. Herstellung von Ganzzelllysaten

Ganzzelllysate wurden für die Detektion von Proteinen mittels Western Blotting benötigt.

Die Zellen wurden ausgesät und kultiviert wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben.

Das Medium in allen wells wurde nach 24 Stunden gewechselt. Nach weiteren 48 Stunden blieben die Zellen unbehandelt oder wurden mit 20µg/ml Etoposid stimuliert. Die Aufarbeitung erfolgte weitere 24 Stunden später.

Zusätzlich wurden bei einigen Versuchen folgende Substanzen in der angegebenen Endkonzentration einzeln verwendet:

- 5,25µM Proteasominhibitor MG132 sechs Stunden vor der Aufarbeitung
- 1µM 5-Azacytidin direkt nach dem Mediumwechsel und 24 Stunden vor der Aufarbeitung
- 50µM MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 24 Stunden vor der Aufarbeitung

Das Medium wurde von den wells abgenommen, in ein 15ml Röhrchen überführt und 2 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 100µl 2xLämmli-Puffer resuspendiert und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die noch adhärennten Zellen wurden mit 200µl 2xLämmli-Puffer pro well und einem Zellschaber aus dem Sixwell gelöst und in das entsprechende Reaktionsgefäß zu dem schon lysierten Pellet

hinzugegeben. Es schloss sich eine fünfminütige Denaturierung bei 95°C im Thermoblock an, ehe das Lysat auf Eis stehend mittels eines Sonicators homogenisiert wurde.

Die Ganzzelllysate wurden bei -20°C aufbewahrt.

#### Pufferzusammensetzung

2xLämmli-Puffer
128 mM Tris Base
4,6% w/v SDS
10% v/v Glycerol
H <sub>2</sub> O <sub>bdest</sub>
pH 7,6

### 3.4.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Der Proteingehalt der Ganzzelllysate und Kernextrakte wurde mit einem Proteinassay entsprechend den Anweisungen des Herstellers bestimmt. Die Analyse erfolgte mit dem Photometer Opsys MR von Dynex Technologies unter Gebrauch der Revelation QuickLink Software.

### 3.4.3. Proteinnachweis

Um einzelne Proteine in Ganzzelllysaten nachzuweisen, wurden diese Proteingemische zunächst elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert (Western Blotting), auf der dann die gesuchten Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen wurden.

#### 3.4.3.1. Einstellung der Proben auf identischen Gesamtproteingehalt

Der Proteinnachweis mittels Gelelektrophorese und Western Blotting ermöglichte nicht nur eine qualitative, sondern auch eine semiquantitative Aussage hinsichtlich der zu untersuchenden Proteine. Für einen semiquantitativen Vergleich verschiedener Proben war es notwendig, gleiche Mengen an Gesamtprotein einzusetzen.

Die Proteinmenge wurde anhand des Proteinassays bestimmt. Von jeder Probe wurde eine festgelegte Proteinmenge zwischen 6µg und 10µg für den Western Blot verwendet.

Jede Probe wurde mit dem Lysispuffer 2xLämmli-Puffer auf ein Endvolumen von 10µl aufgefüllt, so dass alle Proben die gleiche Menge an Protein bei identischem Volumen enthielten. Zum Schluss wurde jeder Probe noch 2xLämmli-Puffer hinzugefügt, der mit 0,02% Bromphenolblau und 2,5% β-Mercaptoethanol versetzt wurde, und zwar in der Menge, die einem Viertel des Endvolumens der Probe entsprach.

### 3.4.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Prinzip: Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Dabei wandern die Proteine entlang einer angelegten Spannung durch ein Polyacrylamidgel. Die Polyacrylamidmoleküle bilden entsprechend ihrem prozentualen Anteil an der Gelsubstanz ein mehr oder weniger engmaschiges Netz, durch das kleine Proteine aufgrund geringerer Reibungskraft schneller als größere Proteine wandern können.

Durchführung: Je nach Fragestellung wurde mit selbstgegossenen SDS-Polyacrylamid-Gelen oder mit Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Fertiggelen gearbeitet. Die im Rahmen dieser Arbeit selbstgegossenen Gele bestanden aus einem Trenngel mit einem Acrylamidgehalt von 8% und einem Sammelgel, dessen Acrylamidanteil bei 4,5% lag. Die Fertiggele waren Gradientengele, deren Acrylamidgehalt abgestuft von 4-20% reichte, so dass ein breites Spektrum unterschiedlich großer Proteine aufgetrennt werden konnte.

Nachdem die Gele in die entsprechenden Gelkammern eingesetzt worden waren, wurden diese mit Laufpuffer aufgefüllt. Die Geltaschen konnten nun mit den vorbereiteten Proben und mit den Proteinmarkern, die ein Gemisch unterschiedlich schwerer Proteine bekannter Größe enthalten, beladen werden.

Durch Anlegen der Spannung begannen die durch die Aufarbeitung negativ geladenen Proteine mit einer ihrem Molekulargewicht entsprechenden Geschwindigkeit durch das Gel in Richtung der Anode zu wandern. Bei selbstgegossenen Gelen wurde das Netzgerät zunächst auf 100 Volt eingestellt, solange sich die Lauffront im Sammelgel befand. Sobald die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 150 Volt hochgeregelt. Gradientengele wurden durchgehend bei 125 Volt belassen. Die Gelelektrophorese wurde gestoppt, als die Lauffront aus dem Gel austrat.

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine Membran transferiert, auf der der Proteinnachweis mit Hilfe spezifischer Antikörper durchgeführt wurde.

#### Pufferzusammensetzung

8%iges Trenngel	4,5%iges Sammelgel
7,25ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	3,0ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
4,0ml 30%iges Acrylamid	0,75ml 30%iges Acrylamid
3,75ml Trenngelpuffer	1,25ml Sammelgelpuffer
50µl 10%iges Ammoniumpersulfat	15µl 10%iges Ammoniumpersulfat
20µl TEMED	10µl TEMED

Trenngelpuffer	Sammelgelpuffer
1,5M Tris Base 0,4% w/v SDS H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> pH 8,8	0,5M Tris Base 0,4% w/v SDS H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> pH 6,8

Laufpuffer
25mM Tris Base 192mM Glycin 0,1% w/v SDS H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

### 3.4.3.3. Proteintransfer (Western Blotting)

Nach der Gelelektrophorese waren die Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Der Transfer aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran erfolgte mittels des Semidry-Blotverfahrens. Dabei wurden folgende Schichten in dieser Reihenfolge in einer Blotkammer gestapelt:

1. sechs Whatman-Filterpapiere, getränkt in Blotting-Puffer 1
2. drei Whatman-Filterpapiere, getränkt in Blotting-Puffer 2
3. die Membran, je eine Minute gewaschen in 100%igem Methanol und H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>
4. das Gel
5. sechs Whatman-Filterpapiere, getränkt in Blotting-Puffer 3

Die Filterpapiere und die Membran entsprachen in ihrer Größe dem Gel. Die Kathode befand sich bei dieser Anordnung auf der Seite des Gels (oben), die Anode auf der Seite der Membran (unten), so dass die nach wie vor negativ geladenen Proteine das Gel verließen und auf die Membran transferiert wurden. Die Transferdauer betrug 45-60 Minuten. Die Stromstärke war abhängig von der Größe der Membran und errechnete sich nach folgender Formel: Stromstärke in mA = Länge in cm x Breite in cm x 1,25.

Schematisch ist die Anordnung in Abbildung 3.2. dargestellt.

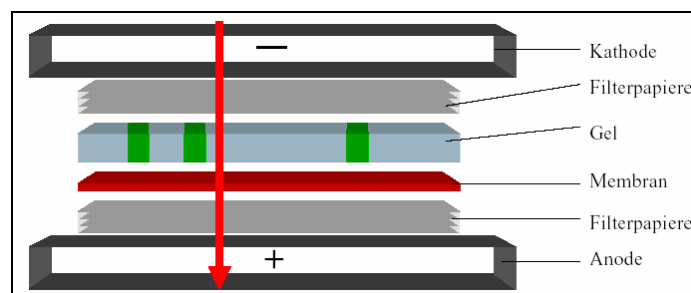


Abb. 3.2. *Proteintransfer: Schichtung in der Blotkammer*  
(Quelle: Arbeitsgruppe Immunologie, Tierärztliche Hochschule Hannover)

## Pufferzusammensetzung

Blotting Puffer 1	Blotting Puffer 2	Blotting Puffer 3
300mM Tris Base 20% v/v Methanol H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	25mM Tris Base 20% v/v Methanol H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	25mM Tris Base 20% v/v Methanol H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> 0,5g 6-Aminocaprinsäure pro 100ml Puffer vor Gebrauch frisch dazugeben

3.4.3.4. Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper

Die Membran wurde nach dem Blotting in ein Schälchen überführt, das im folgenden durchgehend auf einem Schüttler aufbewahrt wurde, so dass sich der Blot in den jeweiligen Flüssigkeiten frei bewegen konnte und nicht austrocknete.

Direkt aus der Blotkammer kam die Membran zunächst für wenige Minuten in den Waschpuffer TBS-Tween, ehe die freien Bindungsstellen mit 5%iger Magermilch in TBS-Tween für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert wurden.

Der spezifische Primärantikörper wurde entsprechend den Herstellerangaben entweder in 5%iger Magermilch oder in 5%igem BSA in TBS-Tween verdünnt. Nach kurzem Waschen der Membran in TBS-Tween im Anschluss an die Blockierung erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4°C, wobei der Blot auch in dieser Zeit auf einem Schüttler konstant in Bewegung gehalten wurde.

Am folgenden Tag wurde die Membran nach drei zehnminütigen Waschgängen in TBS-Tween mit dem entsprechenden Zweitantikörper eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Alle Zweitantikörper waren mit Horseradish-Peroxidase (HRP) gekoppelt und wurden in einer Verdünnung von 1:2000 oder 1:4000 in 5%iger Magermilch eingesetzt.

Nach drei weiteren Waschgängen in TBS-Tween wurde der Blot entwickelt.

## Pufferzusammensetzung

Waschpuffer: TBS-Tween
20mM Tris Base 140mM Natriumchlorid 0,05% v/v Tween 20 H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> pH 7,6

### Primärantikörper für Western Blot Analysen

Antigen	Anwendung des Primärantikörper	Sekundär-antikörper	Anwendung des Sekundärantikörpers
$\alpha$ -Tubulin	1:5000 in 5% BSA in TBS-Tween ü.N.4°C	anti-Maus	1:4000 in 5% Magermilch in TBS 1h RT
Caspase 3	1:1000 in 5% Magermilch in TBS-Tween ü.N.4°C	anti-Kaninchen	1:2000 in 5% Magermilch in TBS 1h RT
Caspase 7	1:1000 in 5% Magermilch in TBS-Tween ü.N.4°C	anti-Kaninchen	1:2000 in 5% Magermilch in TBS 1h RT
Caspase 8	1:1000 in 5% BSA in TBS-Tween ü.N.4°C	anti-Maus	1:2000 in 5% Magermilch in TBS 1h RT
Caspase 9	1:1000 in 5% Magermilch in TBS-Tween ü.N.4°C	anti-Kaninchen	1:2000 in 5% Magermilch in TBS 1h RT
cIAP-1	1:1000 in 5% Magermilch in TBS-Tween ü.N.4°C	anti-Ziege	1:2000 in 5% Magermilch in TBS 1h RT
cIAP-2	1:500 in 5% Magermilch in TBS-Tween ü.N.4°C	anti-Kaninchen	1:2000 in 5% Magermilch in TBS 1h RT
Cleaved Caspase 3	1:250 in 5% Magermilch in TBS-Tween ü.N.4°C	anti-Kaninchen	1:2000 in 5% Magermilch in TBS 1h RT
Cleaved Caspase 9	1:250 in 5% Magermilch in TBS-Tween ü.N.4°C	anti-Kaninchen	1:2000 in 5% Magermilch in TBS 1h RT
Hsp 90 $\alpha/\beta$	1:2000 in 5% Magermilch in TBS-Tween ü.N.4°C	anti-Kaninchen	1:4000 in 5% Magermilch in TBS 1h RT
L1CAM	1:500 in 5% Magermilch in TBS-Tween ü.N.4°C	anti-Maus	1:2000 in 5% Magermilch in TBS 1h RT
Phospho-p44/42 Map-Kinase (Erk1/Erk2)	1:1000 in 5% BSA in TBS-Tween ü.N.4°C	anti-Kaninchen	1:2000 in 5% Magermilch in TBS 1h RT
XIAP	1:1000 in 5% Magermilch in TBS-Tween ü.N.4°C	anti-Ziege	1:2000 in 5% Magermilch in TBS 1h RT

#### 3.4.3.5. Detektion mittels Chemolumineszenz

Das nach Herstellerangaben eingesetzte Substrat wurde durch die an den Zweitantikörper gebundene Peroxidase umgesetzt. Das emittierte Licht wurde entweder mittels eines Röntgenfilms oder direkt mit einer Digitalkamera (ChemiDoc-System Firma BioRad) dargestellt, so dass die zu detektierenden Proteine in Form von Banden sichtbar wurden. Mittels der Proteinmarker konnte die Größe der detektierten Proteine festgestellt werden.

### **3.5. RNA-Techniken**

#### **3.5.1. RNA-Isolierung**

Die RNA-Isolierung diente der Gewinnung von mRNA, die anschließend mittels des Enzyms Reverse Transkriptase zu Einzelstrang-cDNA umgewandelt und für Realtime PCRs eingesetzt wurde. Die Zellen wurden ausgesät und kultiviert wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben. Das Medium in allen wells wurde nach 24 Stunden gewechselt. Nach weiteren 72 Stunden wurde das Medium verworfen und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen. Die Aufarbeitung erfolgte mit einem RNA-Isolierungs-Kit nach den Angaben des Herstellers. Der mRNA-Gehalt der Proben wurde im Anschluss photometrisch mit Hilfe eines Gene Quant Gerätes bestimmt. Die gewonnene mRNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

#### **3.5.2. Herstellung von cDNA**

##### 3.5.3.1. Prinzip der Methode

RNA-Abschnitte werden mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, Oligo-DT-Primern und Nukleotiden in Einzelstrang-cDNA umgeschrieben. Mit der entstandenen cDNA werden dann Realtime-PCRs durchgeführt.

##### 3.5.3.2. Durchführung

Pro Probe wurde das Volumen in Mikroliter eingesetzt, das einer mRNA-Menge von 2µg entsprach. Dieses Volumen wurde mit Ribonuklease-freiem Wasser auf insgesamt 11,4µl aufgefüllt und mit 2µl Oligo-DT-Primer (Endkonzentration 1µg/25µl) versehen. Die Probe wurde kurz gemischt und zentrifugiert, ehe sie für 5 Minuten bei 70°C im Thermomixer denaturiert wurde. Nach einer einminütigen Kühlung auf Eis wurden jedem Ansatz 11,6µl Mastermix zugefügt. Das Ganze wurde nochmals gemischt, zentrifugiert und anschließend für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Die so hergestellte cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

Mastermix je Probe
5µl M-MLV-5x First Strand Buffer 1,25µl dATP (10mM) 1,25µl dCTP (10mM) 1,25µl dGTP (10mM) 1,25µl dTTP (10mM) 0,6µl RNAsin RNase Inhibitor (40U/µl) 1,0µl M-MLV-Reverse Transkriptase (200U/µl)

---

### **3.6. DNA-Techniken**

#### **3.6.1. Echtzeit-Polymerasekettenreaktion**

**(Realtime Polymerase Chain Reaction = Realtime-PCR)**

##### **3.6.1.1. Prinzip der Methode**

Die PCR ermöglicht eine selektive Vermehrung spezifischer DNA-Abschnitte.

Mit der Realtime-PCR kann eine relative und auch absolute Quantifizierung eines PCR-Produktes erfolgen, indem die exponentielle Zunahme dieses Produktes bis zum Erreichen seines Synthesemaximums verfolgt wird.

Das Messprinzip basiert auf einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, der sich in die entstehende Doppelstrang-DNA einlagert. Diese Bindung verstärkt die emittierte Fluoreszenz proportional zu der Zahl der vorhandenen Doppelstränge, so dass die Lichtemission zu jeder Zeit einen Rückschluss auf die Menge der synthetisierten DNA und damit auch auf die Menge der Ausgangskopien im PCR-Ansatz zulässt.

Zunächst ist nur die Basisfluoreszenz zu beobachten, die der Farbstoff auch ohne DNA-Bindung abstrahlt. Mit steigender Anzahl der PCR-Zyklen nimmt die Fluoreszenz -wie auch die Menge an DNA- exponentiell zu. Der Verlauf der PCR kann in Echtzeit verfolgt werden, indem nach jedem PCR-Zyklus bis zum Erreichen des Maximums die Fluoreszenz gemessen wird.

Der Fluoreszenzfarbstoff lagert sich allerdings in jede Art von Doppelstrang-DNA ein, so dass nicht nur das spezifische PCR-Produkt, sondern zu einem Teil auch unspezifische DNA, die die Probe verunreinigt, oder Primerdimere, die im Laufe der PCR entstehen, für die Fluoreszenz verantwortlich sein können. Daher schließt man an das Ende der eigentlichen PCR-Laufzeit noch eine Schmelzkurvenanalyse an. Dabei werden die DNA-Doppelstränge durch die schrittweise Temperaturerhöhung wieder voneinander getrennt, so dass die Fluoreszenz zurück geht. Verunreinigungen und Primerdimere, die kleiner sind als die spezifischen PCR-Produkte, schmelzen eher, so dass sie anhand der Schmelzkurve von den spezifischen Produkten zu unterscheiden sind.



### 3.6.1.2. Relative Quantifizierung des PCR-Produktes

Die Quantifizierung der DNA-Menge beruht nicht auf der absoluten Menge des PCR-Produktes, sondern auf dem Verlauf der PCR-Reaktion.

Zur Berechnung zieht man den Fluoreszenz-Schwellenwert (Threshold Cycle) heran. Dieser Schwellenwert bezeichnet genau den PCR-Zyklus, in dem die gemessene Fluoreszenz die Basisfluoreszenz signifikant übersteigt. Zu diesem Zeitpunkt ist die DNA-Synthese nicht durch nachlassende Enzymaktivität, Nukleotidmangel oder verbrauchte Primer limitiert und verläuft exponentiell.

Ein Vergleich zweier Proben zu diesem Zeitpunkt erlaubt eine semiquantitative Aussage über die Menge der Ausgangs-DNA. Bei der Probe, die mehr Zyklen benötigt, um den Schwellenwert zu erreichen, sind in dem betreffenden PCR-Ansatz weniger Ausgangskopien enthalten. Um diese semiquantitative Aussage aufrecht erhalten zu können, muss allerdings mit jeder Probe auch eine PCR auf ein *“housekeeping“* Gen, z.B.  $\beta$ -Aktin, durchgeführt werden. Ein Vergleich der Cyclezahl bei Erreichen des Thresholds sollte hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben aufweisen.

Zur Auswertung wird folgende Formel herangezogen:

$$x = 2^{y1-y2}/2^{z1-z2}$$

$y1$  = Cyclezahl Referenzprobe gesuchtes Gen

$y2$  = Cyclezahl zu messende Probe gesuchtes Gen

$z1$  = Cyclezahl Referenz *“housekeeping“* Gen ( $\beta$ -Aktin)

$z2$  = Cyclezahl zu messende Probe *“housekeeping“* Gen ( $\beta$ -Aktin)

Das Ergebnis  $x$  gibt den Faktor an, wieviel mehr ( $x > 1$ ) oder weniger ( $x < 1$ ) Ausgangskopien von dem gesuchten DNA-Abschnitt in der zu messenden Probe vorhanden sind.

### 3.6.1.3. Durchführung

Die PCR erfolgte in einer 96well PCR-Platte. Als Matrize diente cDNA, die zuvor aus mRNA der mono- und cokultivierten Panc89-Zellen hergestellt wurde. Von allen Ansätzen wurden Doppelwerte angefertigt.

Es wurden 1,3  $\mu$ l cDNA je Probe vorgelegt und anschließend 8,7  $\mu$ l des jeweiligen Primermixes hinzugegeben. Zum Schluss wurden mit einer Multipipette 10  $\mu$ l des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green hinzugefügt, der als fertiges Reaktionsgemisch alle essentiellen PCR-Reagenzien enthält. Die Platte wurde mit einer selbstklebenden Folie versiegelt und die PCR erfolgte unter Anwendung der MyiQ-Software in dem iCycler MyiQ Single Color Real-Time PCR Detection System.

Mastermix für Caspase-Primer je Probe	Mastermix für $\beta$ -Aktin-Primer je Probe
3,25 $\mu$ l Primer-Mix 5,45 $\mu$ l Ribonuklease-freies Wasser	0,50 $\mu$ l Vorwärtsprimer 0,50 $\mu$ l Rückwärtsprimer 7,70 $\mu$ l Ribonuklease-freies Wasser

### **3.7. Enzym-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)**

#### **3.7.1. Prinzip der Methode**

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren. Er basiert auf einer spezifischen Antigen-Antikörper Bindung, die durch eine enzymatische Farbreaktion sichtbar gemacht wird.

#### **3.7.2. Durchführung**

Mittels ELISA-Kit wurden in der vorliegenden Arbeit NF- $\kappa$ B in Kernextrakten semiquantitativ und Zytokine in Zellkulturüberständen quantitativ bestimmt.

##### **3.7.2.1. NF- $\kappa$ B ELISA**

Prinzip: Ist in den Proben NF- $\kappa$ B aktiviert, bindet dieses an die NF- $\kappa$ B-Konsensussequenz, mit der die ELISA-Platten beschichtet sind. Das spezifische Epitop, das von dem Primärantikörper erkannt wird, ist für diesen nur zugänglich, wenn NF- $\kappa$ B aktiviert und an seine Ziel-DNA gebunden ist. Der HRP-gekoppelte Zweitantikörper gewährleistet, dass die erfolgte Bindung des Primärantikörpers an das aktivierte NF- $\kappa$ B durch eine enzymatische Farbreaktion im Photometer sichtbar gemacht werden kann. Die gemessene optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450nm lässt eine semiquantitative Aussage über die Menge des aktivierten NF- $\kappa$ B zu.

Durchführung: Zur Bestimmung von aktiviertem NF- $\kappa$ B (p65-Untereinheit) mit Hilfe des spezifischen ELISAs wurden Kernextrakte hergestellt wie unter Punkt 3.4.1.1. beschrieben. Nachdem deren Proteingehalt bestimmt worden war, wurde der ELISA gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

##### **3.7.2.2. IL1 $\beta$ -ELISA**

Mit dem eingesetzten ELISA wurde das durch die mono- bzw. cokultivierten Tumorzellen sezernierte humane IL1 $\beta$  im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Aufgrund der hohen Spezifität dieses ELISAs wurde murines IL1 $\beta$  nicht detektiert. Die Zellen wurden ausgesät

und kultiviert wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben. Das Medium in allen wells wurde nach 24 Stunden gewechselt. Nach weiteren 72 Stunden wurde das Medium abpipettiert und in einem 15ml Röhrchen bei 1350 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und entweder sofort für den ELISA verwendet oder vorübergehend bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden abtrypsinisiert und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Menge an sezerniertem IL1 $\beta$  konnte damit auf eine definierte Zellzahl bezogen werden. Der Assay wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **3.8. Tierexperimentelle Methoden**

Weibliche SCID-Mäuse (Stamm C.B-17/IcrHsd-scid) im Alter von 4-6 Wochen wurden von Harlan Winkelmann bezogen und unter pathogenfreien Bedingungen im Tierhaus der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel gehalten. Die Umgebungstemperatur betrug konstante 20°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 55%. Ein Zeitschaltsystem gewährleistete einen Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 zu 12 Stunden.

Je acht Tiere wurden in einem Standardkäfig Typ 3 Makrolon gehalten, welcher mit Einstreu, Plastikhäuschen, Papprollen und Zellstoff ausgestaltet war. Fertigfutter und Wasser wurden den Mäusen ad libitum zur Verfügung gestellt. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde regelmäßig adspektorisch und durch Gewichtskontrollen überwacht.

Die in den tierexperimentellen Versuchen verwendeten Zellen wurden wie unter Punkt 3.2.1. beschrieben in Kultur gehalten.

Nach einer einwöchigen Eingewöhnungsphase wurden den Tieren subkutan in die rasierte und desinfizierte linke Flanke entweder  $5 \times 10^5$  Panc89-Zellen (Mono-Tumore) oder ein Gemisch aus  $5 \times 10^5$  Panc89-Zellen mit  $1,25 \times 10^6$  murinen Fibroblasten (Co-Tumore) injiziert. Die Zellen waren in beiden Fällen in 100 $\mu$ l physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Die Inokulation fand unter einer Diethylether-Kurzzeitnarkose statt.

Das Wachstum der Tumore wurde regelmäßig kontrolliert. Bei Erreichen einer durchschnittlichen Tumorgroße von 20 mm<sup>2</sup> wurden die Tiere innerhalb der Mono- bzw. Co-Gruppe randomisiert und auf insgesamt 8 Gruppen aufgeteilt. Tiere der Gruppen 1-4 blieben unbehandelt. Die Mäuse der Gruppen 1 und 2 wurden 13 Tage nach Tumorinokulation (= Entnahmezeitpunkt 1), die der Gruppen 3 und 4 20 Tage nach Tumorinokulation (= Entnahmezeitpunkt 2) mit CO<sub>2</sub> betäubt und durch Genickbruch getötet. Die Primärtumore wurden entnommen, vermessen, gewogen und in Flüssigstickstoff für immunhistologische

Analysen schockgefroren. Die Mäuse der Gruppen 5-8 wurden entweder mit dem Zytostatikum Etoposid behandelt oder ihnen wurde ein entsprechendes Volumen 0,9%ige Natriumchloridlösung injiziert. Das Etoposid wurde in einer Dosierung von 6,5µg/g<sub>KGW</sub> intraperitoneal einmal täglich über vier Tage verabreicht. Nach einer fünftägigen Pause erhielten die Tiere einen weiteren viertägigen Behandlungszyklus. Die Mäuse der Gruppen 5-8 wurden 5 Tage nach dem Ende des zweiten Behandlungszyklus (= Entnahmezeitpunkt 3) mit CO<sub>2</sub> betäubt und durch Genickbruch getötet. Die Primärtumore wurden entnommen, vermessen, gewogen und in Flüssigstickstoff für immunhistologische Analysen schockgefroren. Die Tabelle Nr. 3.1. zeigt eine Übersicht der tierexperimentellen Versuche.

Tab. 3.1.: Übersicht über die tierexperimentellen Versuche

Gruppennummer	Tumorzusammensetzung	Behandlung	Tumorentnahme
1	Mono-Tumore 5x10 <sup>5</sup> Panc89/Tier	keine	13 Tage nach Inokulation = <b>Zeitpunkt 1</b>
2	Co-Tumore 5x10 <sup>5</sup> Panc89 + 1,25x10 <sup>6</sup> Fibroblasten/Tier	keine	13 Tage nach Inokulation = <b>Zeitpunkt 1</b>
3	Mono-Tumore 5x10 <sup>5</sup> Panc89/Tier	keine	20 Tage nach Inokulation = <b>Zeitpunkt 2</b>
4	Co-Tumore 5x10 <sup>5</sup> Panc89 + 1,25x10 <sup>6</sup> Fibroblasten/Tier	keine	20 Tage nach Inokulation = <b>Zeitpunkt 2</b>
5	Mono-Tumore 5x10 <sup>5</sup> Panc89/Tier	0,9%NaCl	5 Tage nach Ende der Behandlung (~34. Tag nach Inokulation) = <b>Zeitpunkt 3</b>
6	Mono-Tumore 5x10 <sup>5</sup> Panc89/Tier	Etoposid	5 Tage nach Ende der Behandlung (~34. Tag nach Inokulation) = <b>Zeitpunkt 3</b>
7	Co-Tumore 5x10 <sup>5</sup> Panc89 + 1,25x10 <sup>6</sup> Fibroblasten/Tier	0,9%NaCl	5 Tage nach Ende der Behandlung (~34. Tag nach Inokulation) = <b>Zeitpunkt 3</b>
8	Co-Tumore 5x10 <sup>5</sup> Panc89 + 1,25x10 <sup>6</sup> Fibroblasten/Tier	Etoposid	5 Tage nach Ende der Behandlung (~34. Tag nach Inokulation) = <b>Zeitpunkt 3</b>

Die Tierversuchsgenehmigung wurde am 24. März 2005 durch das Ministerium für Umwelt, Naturschutz und Landwirtschaft des Landes Schleswig-Holstein erteilt.

### **3.9. Immunzytologie**

Die Immunzytologie beruht auf der Bindung eines spezifischen Antikörpers an ein gesuchtes Antigen in fixierten Zellen. Diese Bindung kann mit verschiedenen Detektionssystemen sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurde die Methode verwendet, um den myofibroblastischen Phänotyp von isolierten Pankreasfibroblasten nachzuweisen.

### 3.9.1. Charakterisierung von murinen Pankreasfibroblasten mittels Immunzytologie

Bevor die frisch isolierten Fibroblasten in Versuchen verwendet worden sind, wurden sie auf ihren myofibroblastischen Phänotyp durch eine immunzytologische Färbung auf “ *$\alpha$ -Smooth Muscle Actin*“ ( $\alpha$ -SMA), Vimentin und Desmin überprüft.

Dazu wurden runde Deckgläschen steril in eine Sixwell-Platte eingebracht und in jedes well  $1 \times 10^5$  Fibroblasten in 2,0 ml Fibroblastenmedium ausgesät. Nach 24 Stunden Wachstum wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Fixierung der Zellen auf den Deckgläschen durch das zehnminütige Einwirken von 100% Methanol bei  $-20^\circ\text{C}$ . Die Gläschen wurden nach einem erneuten fünfminütigen Waschgang mit PBS in eine Feuchtekammer gelegt und zur Blockierung für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 4% BSA in PBS überschichtet. Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit den Erstantikörpern bei  $4^\circ\text{C}$  über Nacht. Der Antikörper gegen  $\alpha$ -SMA wurde in einer Verdünnung von 1:500 und derjenige gegen Vimentin in einer Verdünnung von 1:400 jeweils in 4% BSA in PBS eingesetzt, während der Antikörper gegen Desmin eine Verdünnung von 1:200 ebenfalls in 4% BSA in PBS erforderte.

Am folgenden Tag wurden die Gläschen zunächst dreimal je 5 Minuten in PBS gewaschen. Auf das Präparat, mit dem  $\alpha$ -SMA nachgewiesen werden sollte, wurde ein Tropfen EnVision Konjugat anti-Maus-Peroxidase gegeben. Für die Vimentinfärbung wurde ein Biotin-gekoppelter Esel-anti-Ziege Zweitantikörper verwendet, der 1:200 in PBS verdünnt wurde. Der Zweitantikörper für die Detektion von Desmin war ein Biotin-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper, der 1:200 in PBS verdünnt wurde. Die Inkubationszeit mit allen Zweitreagenzien betrug 45 Minuten bei Raumtemperatur, bevor erneut in PBS gewaschen wurde. Gegen die Biotin-gekoppelten Zweitantikörper erfolgte im Anschluss eine 45minütige Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase, die 1:500 in PBS verdünnt wurde. Nach dreimaligem Waschen in PBS für je 5 Minuten wurde die Substratlösung für 5 bis 15 Minuten je nach Färbeintensität aufgebracht. Es folgte ein zehnminütiger Waschgang in Leitungswasser sowie im Anschluss die Kernfärbung mit einer 1:2 in Wasser verdünnten Hämalaunlösung, in die die Präparate für 1 Minute getaucht wurden. Das Entfernen überschüssiger Farbe aus dem Zytoplasma und das Bläuen der Zellkerne erfolgte anschließend für 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser. Die Deckgläschen wurden zum Schluss mit Hilfe von angewärmter Glyceringelatine mit der Oberseite nach unten auf einem Objektträger befestigt.

---

### **3.10. Immunhistologie**

Immunhistologische Nachweisverfahren beruhen auf einer spezifischen Antikörper-Antigen Bindung in Gewebeschnitten, die durch verschiedene Detektionsmethoden sichtbar gemacht werden kann.

#### **3.10.1. Durchführung**

In Flüssigstickstoff schockgefrorene Tumore wurden mit Hilfe eines Kryomikrotoms als 6µm dicke Schnitte auf unbeschichtete Objektträger gezogen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Schnitte wurden anschließend bei -20°C aufbewahrt oder sofort weiter bearbeitet.

Zur Fixierung wurden die Objektträger für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Aceton gestellt, das zuvor mit 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt wurde. Erst nachdem die Schnitte anschließend getrocknet waren, wurden sie für 5 Minuten in PBS überführt. Es folgte die Blockierung des endogenen Biotins mittels eines Biotin-Blocking-Systems, das nach Herstellerangaben angewendet wurde. Im Anschluss wurden die Präparate dreimal je 5 Minuten in PBS gewaschen. Im Fall der Caspase-Färbungen wurde stattdessen dreimal mit einer Lösung aus 0,1% Triton in PBS und einmal 5 Minuten nur in PBS gewaschen. Zur Blockierung wurden die Objektträger dann in eine Feuchtekammer gelegt und bei Raumtemperatur entweder mit 4% BSA in PBS oder 4% NRS in PBS überschichtet. Nach einer einstündigen Einwirkzeit wurde die Blockierlösung entfernt und der verdünnte Primärantikörper (siehe Punkt 3.10.2.) auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte entweder bei 4°C über Nacht oder für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Danach wurden die Objektträger zunächst dreimal je 5 Minuten in PBS bzw. dreimal je 5 Minuten in PBS-Triton und einmal 5 Minuten in PBS gewaschen. Die Wahl des nun folgenden Detektionssystems richtete sich nach dem Erstantikörper und kann unter Punkt 3.10.2. nachgelesen werden.

Die Substratlösung wurde für 5 bis 15 Minuten je nach Färbeintensität aufgebracht. Anschließend standen die Präparate für 10 Minuten in Leitungswasser. Es folgte eine Kernfärbung mit einer 1:2 in Wasser verdünnten Hämalaunlösung, in die die Präparate für 1 Minute getaucht wurden. Das Entfernen überschüssiger Farbe aus dem Zytoplasma und das Bläuen der Zellkerne erfolgte anschließend für 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser. Die Präparate wurden mit Hilfe von angewärmter Glyceringelatine und Deckgläschen eingedeckt.

### 3.10.2. Antikörper und Detektionssysteme

Antigen	Blockierung	Anwendung des Primärantikörpers	Sekundär-antikörper	Anwendung des Sekundärantikörpers	Detektionssysteme und Reagenzien
Caspase 3	4% BSA in PBS	1:100 in 1% BSA in PBS ü.N. 4°C	Biotin-SP-konjugiertes Esel Anti-Ziege IgG	1:200 in PBS 45min. RT	Streptavidin-Peroxidase, 1:500 in PBS 45min. RT
Caspase 7	4% BSA in PBS	1:100 in 1% BSA in PBS ü.N. 4°C	Biotin-SP-konjugiertes Esel Anti-Ziege IgG	1:200 in PBS 45min. RT	Streptavidin-Peroxidase, 1:500 in PBS 45min. RT
Caspase 8	4% BSA in PBS	1:50 in 1% BSA in PBS ü.N. 4°C	-	-	EnVision anti-Maus Anwendung nach Herstellerangaben
Caspase 9	4% BSA in PBS	1:50 in 1% BSA in PBS ü.N. 4°C	Biotin-SP-konjugiertes Esel Anti-Ziege IgG	1:200 in PBS 45min. RT	Streptavidin-Peroxidase, 1:500 in PBS 45min. RT
Cytokeratin	4% BSA in PBS	1:500 in 1% BSA in PBS 1h RT	Peroxidase-konjugiertes Esel Anti-Maus IgG	1:200 in PBS 45min. RT	-
Desmin für Immunzytologie	4% BSA in PBS	1:200 in 4% BSA in PBS ü.N. 4°C	Biotin-SP-konjugiertes Ziege Anti-Kaninchen IgG	1:200 in PBS 45min. RT	Streptavidin-Peroxidase, 1:500 in PBS 45min. RT
Ki67	4% NRS in PBS	1:250 in 1% NRS 1h RT	-	-	EnVision anti-Maus Anwendung nach Herstellerangaben
TUNEL-Kit	Anwendung nach Herstellerangaben				
Vimentin für Immunzytologie	4% BSA in PBS	1:400 in 4% BSA in PBS ü.N. 4°C	Biotin-SP-konjugiertes Esel Anti-Ziege IgG	1:200 in PBS	Streptavidin-Peroxidase, 1:500 in PBS
$\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin für Immunzytologie und -histologie	4% BSA in PBS	1:500 in 4% BSA in PBS ü.N. 4°C	-	-	EnVision anti-Maus Anwendung nach Herstellerangaben

### 3.10.3. Auswertung der immunhistologischen Schnitte

#### 3.10.3.1. Pan-Cytokeratin und " $\alpha$ -Smooth Muscle Actin" ( $\alpha$ -SMA)

Zur Auswertung der Färbungen auf Pan-Cytokeratin und  $\alpha$ -SMA wurde ein Index von 0 (keine gefärbten Zellen) bis 3 (sehr viele gefärbte Zellen) Punkten verwendet. Die Begutachtung der Schnitte erfolgte „blind“, d.h. ohne Kenntnis, um welchen Tumorschnitt es sich handelte, um eine Voreingenommenheit auszuschließen. Jeder Tumor wurde dreimal von derselben Beobachterin betrachtet und erhielt als Punktzahl den Mittelwert der drei Beurteilungen.

### 3.10.3.2. TUNEL

Mit der TUNEL-Färbung (*“Terminal Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling“*) können bei der Apoptose auftretende Einzelstrangbrüche in der genomischen DNA nachgewiesen werden. Auf diesem Weg kann eine lichtmikroskopische Identifizierung apoptotischer Zellen im Tumorgewebe erfolgen.

Die Tiere wurden zwei je viertägigen Behandlungszyklen mit Etoposid bzw. 0,9%iger Natriumchloridlösung unterzogen. Fünf Tage nach Therapieende wurden die Primärtumore entnommen, vermessen und für immunhistologische Analysen schockgefroren. Zur Auswertung wurde der gesamte Schnitt eines Tumors bei 400facher Vergrößerung durchmustert, dabei für jeden Ausschnitt die Anzahl der apoptotischen Zellen pro *“High Powered Field“* (HPF) bestimmt und im Anschluss ein Mittelwert für den Tumor gebildet. Die Begutachtung der Schnitte erfolgte „blind“, d.h. ohne Kenntnis, um welchen Tumorschnitt es sich handelte, um eine Voreingenommenheit auszuschließen.

### 3.10.3.3. Ki67

Zur Auswertung der Färbungen auf den Proliferationsmarker Ki67 wurden Tumoren des letzten Entnahmezeitpunktes (fünf Tage nach Ende der Behandlung) überprüft. Dabei wurde ein Index von 0 bis 4 Punkten verwendet, in dem folgende Abstufungen galten:

Punkte	Prozent positive Bereiche
0	0
1	0-20
2	20-50
3	50-80
4	80-100

Die Begutachtung der Schnitte erfolgte „blind“, d.h. ohne Kenntnis, um welchen Tumorschnitt es sich handelte, um eine Voreingenommenheit auszuschließen. Jeder Tumor wurde dreimal von derselben Beobachterin betrachtet und erhielt als Punktzahl den Mittelwert der drei Beurteilungen.

### 3.10.3.4. Procaspasen

Die Procaspase-Expression wurde in den Tumoren des letzten Entnahmezeitpunktes aller drei Versuche immunhistologisch untersucht. Die Begutachtung der Schnitte erfolgte „blind“, d.h. ohne Kenntnis, um welchen Tumorschnitt es sich handelte, um eine Voreingenommenheit auszuschließen. Jeder Tumor wurde dreimal von derselben Beobachterin betrachtet und erhielt als Punktzahl den Mittelwert der drei Beurteilungen.



---

### **3.11. Statistik**

Alle Berechnungen wurden mit dem doppelseitigen t-Test durchgeführt.

Es wurde das Statistikprogramm SISA verwendet: <http://home.clara.net/sisa/>

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Isolation und Expansion muriner Pankreasfibroblasten

Für die Co-Kulturexperimente *in vitro* und *in vivo* wurden als Stromakomponente murine Pankreasfibroblasten verwendet. Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen aus den Pankreata von weiblichen SCID-Mäusen isoliert (siehe Punkt 3.1.). Die beschriebene Art der Aufarbeitung und die genannten Kulturbedingungen ermöglichten eine hoch selektive Expansion von Pankreasfibroblasten. Eine ausreichende Migration von Fibroblasten aus Pankreasgewebestückchen war nach etwa drei Wochen erreicht (siehe Abbildung Nr. 4.1.), so dass die Fibroblasten nach Ablösen von den Zellkulturschalen in Zellkulturflaschen überführt werden konnten.

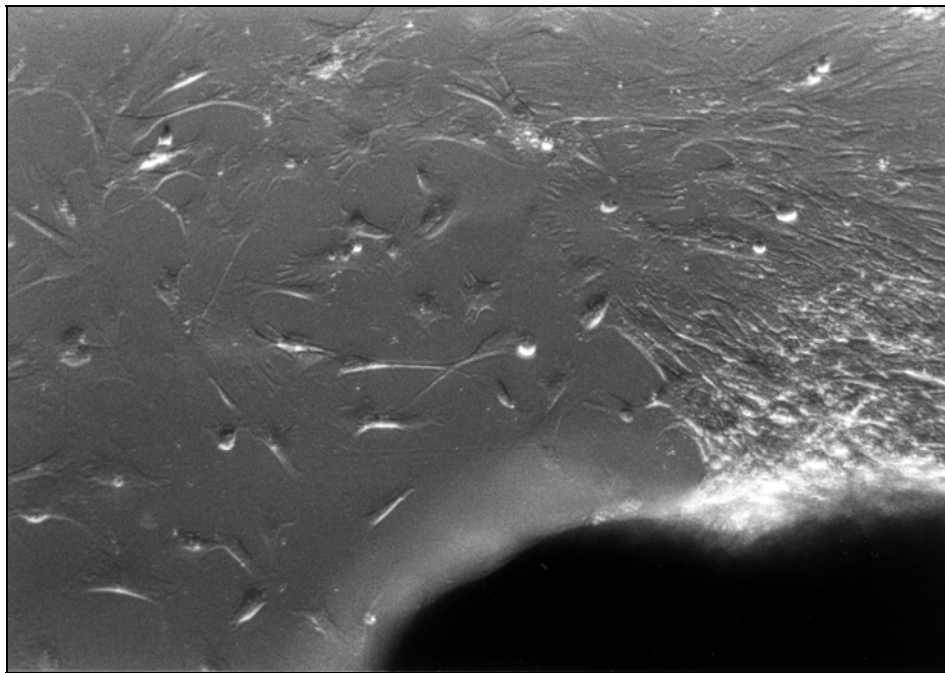


Abb. Nr. 4.1.: *Expansion muriner Pankreasfibroblasten ca. drei Wochen nach der Isolation aus Mauspancreata, 100fache Vergrößerung*

Rechts unten ist ein Pankreasgewebestück zu sehen, aus dem die Fibroblasten auswachsen.

#### **4.2. Charakterisierung der isolierten Pankreasfibroblasten mittels immunzytologischer Färbung**

Vor der weiteren Verwendung der gewonnenen Fibroblasten wurde der myofibroblastische Phänotyp der Zellen durch immunzytologische Färbungen auf die Expression von “ *$\alpha$ -Smooth Muscle Actin*“ ( $\alpha$ -SMA), Desmin und Vimentin überprüft. Die isolierten Fibroblasten zeigten sich für die drei genannten Marker positiv, wie auf den Abbildungen 4.2. bis 4.4. zu sehen ist. Die Isotypenkontrolle zeigte keine Färbung [Daten nicht gezeigt].

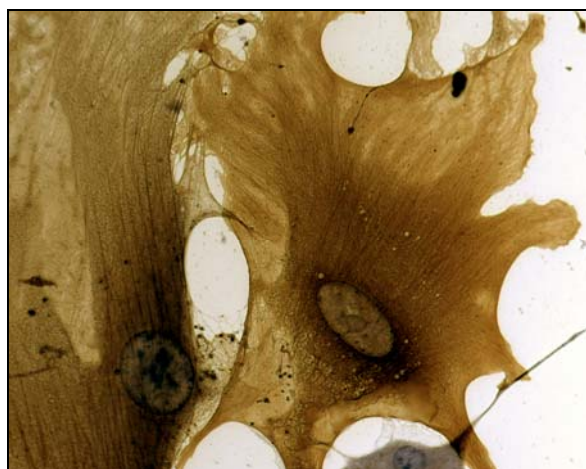


Abb. 4.2.: Immunzytologische Färbung von Fibroblasten auf  $\alpha$ -SMA  
400fache Vergrößerung  
Die isolierten Zellen sind für den Marker  $\alpha$ -SMA positiv.

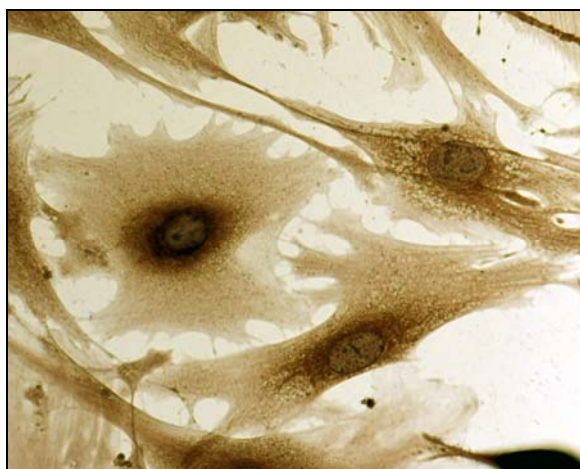


Abb. 4.3.: Immunzytologische Färbung von Fibroblasten auf Desmin  
400fache Vergrößerung  
Die isolierten Zellen sind für den Marker Desmin positiv.

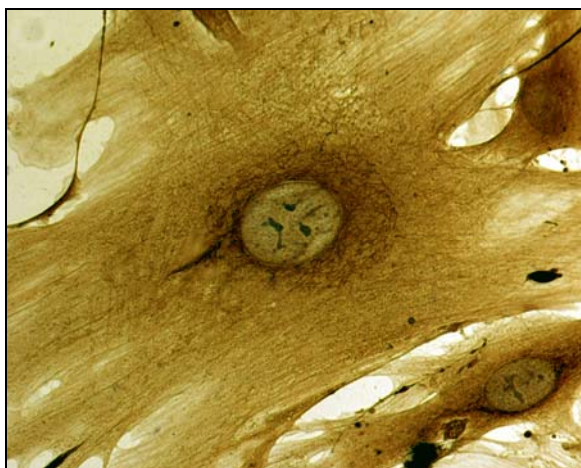


Abb. 4.4.: Immunhistologische Färbung von Fibroblasten gegen Vimentin,  
400fache Vergrößerung  
Die isolierten Zellen sind für den Marker Vimentin positiv.

### **4.3. Versuche in vitro: Vergleich von kokultivierten und monokultivierten Panc89-Zellen**

#### **4.3.1. Apoptosemessung mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie**

Die Bestimmung der Apoptoserate mono- und kokultivierter Panc89-Zellen nach Etoposidbehandlung wurde mittels einer Annexin V-FITC-/PI-Färbung mit anschließender Fluoreszenz-Durchflusszytometrie im Verlauf mehrerer Wochen gemessen. Die Zellen blieben unbehandelt oder wurden für 24 Stunden mit 20µg/ml Etoposid stimuliert, ehe die weitere Aufarbeitung wie unter Punkt 3.3.2. beschrieben erfolgte.

Die Daten wurden mit Hilfe der Flomax Software ausgewertet. Eine repräsentative durchflusszytometrische Messung von mono- und kokultivierten Panc89-Zellen im Originalausdruck ist als Beispiel in der Abbildung 4.5. dargestellt. Zellen, die sich im Prozess der Apoptose befinden, externalisieren Phosphatidylserin. An dieses bindet das Annexin V-FITC, so dass apoptotische Zellen durch diesen Farbstoff markiert werden. In der frühapoptotischen Phase (Quadrant Q4) besteht noch eine intakte Zellmembran, so dass eine zusätzliche Färbung mit dem interkalierenden Farbstoff PI nicht stattfinden kann. Im spätapoptotischen Stadium (Quadrant Q2) ist die Integrität der Membran nicht mehr gegeben, so dass die Zelle nun sowohl durch Annexin V-FITC als auch durch PI markiert wird. Nekrotische Zellen werden nur durch PI gefärbt (Quadrant Q1).

In die Auswertung jeder Messung (4.5.A bis 4.5.D) wurden jeweils die Quadranten Q4 und Q2 einbezogen, die zusammen den Anteil der apoptotischen Zellen repräsentieren. Die Differenz zwischen dem Anteil der apoptotischen Zellen in der mit Etoposid behandelten Probe und dem in der unbehandelten Probe ergab die induzierte spezifische Apoptose:  $(Q4_{\text{Eto}} + Q2_{\text{Eto}}) - (Q4_{\text{ub}} + Q2_{\text{ub}}) = \text{spezifische Apoptose}$ . Wie in diesem Beispiel zu sehen, unterschieden sich mono- und kokultivierte Panc89-Zellen vor der Etoposidbehandlung kaum voneinander (siehe Abbildungen 4.5.A und 4.5.C). Jedoch betrug die spezifische Apoptose in diesem Beispiel nach Etoposidbehandlung bei den monokultivierten Panc89-Zellen 49,42%, während es bei den kokultivierten Panc89-Zellen nur 2,80% waren.

Für die Gesamtauswertung wurden die Messungen von fünf unabhängigen mehrwöchigen Versuchsdurchgängen sowie deren Mittelwerte für monokultivierte (= Mono), cokultivierte (= Co) und zunächst co- dann wieder monokultivierte (= MaC) Panc89-Zellen vergleichend in der Abbildung 4.6. dargestellt. Die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen sind zudem in Tabelle 4.1. gesondert aufgeführt.

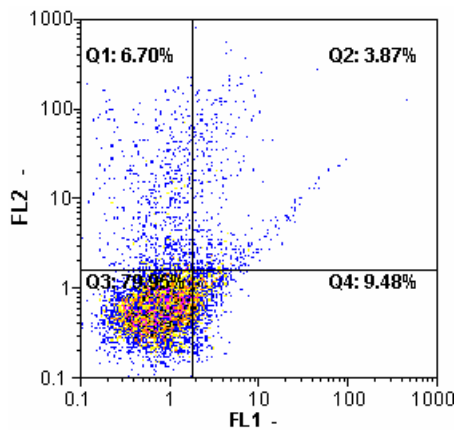
Die Bewertung der einzelnen Versuche (siehe Abbildung 4.6.) ergab, dass mit Ausnahme der jeweils zweiten Woche des dritten und fünften Durchganges in allen Messungen die Apoptoserate nach Etoposidbehandlung in der Co-Kultur geringer als in der Mono-Kultur war. Im Mittel der fünf unabhängigen mehrwöchigen Versuchsdurchgänge war die Apoptoseinduktion durch Etoposid in cokultivierten Panc89-Zellen in jeder Woche geringer als in monokultivierten Panc89-Zellen. Dieser Unterschied war bis auf die Wochen zwei und fünf statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

Die Apoptoserate der cokultivierten Panc89-Zellen nach Etoposidbehandlung betrug im Mittel der Wochen nur etwa ein Drittel der Apoptoserate der monokultivierten Zellen.

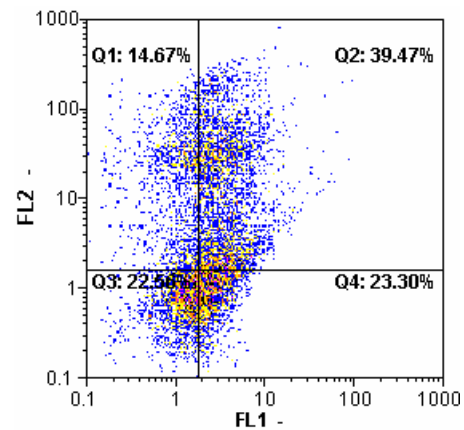
Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass durch die Co-Kultur mit murinen Pankreasfibroblasten die Resistenz von Panc89-Zellen gegenüber einer Zytostatikabehandlung mit Etoposid signifikant erhöht wird.

Weiterhin sollte die Fähigkeit der Panc89-Zellen untersucht werden, einen resistenten Phänotyp nach Ende der Co-Kultur beizubehalten. Dazu wurden jede Woche Tumorzellen aus der Co-Kultur entnommen und wieder ohne Fibroblasten monokultiviert. Auf diese Weise entstanden jede Woche die „Mono-aus-Co-Zellen“ (MaC-Zellen), die von mindestens einer Woche an aufwärts unterschiedlich lange cokultiviert wurden, bevor sie wieder ohne Fibroblasten für eine Woche monokultiviert worden sind. MaC-Zellen z.B. der Woche zwei waren somit eine Woche in Co-Kultur und im Anschluss wieder eine Woche in Mono-Kultur, solche der vierten Woche drei Wochen in Co-Kultur und eine Woche in Monokultur. Der Vergleich der Apoptoserate zwischen Mono- und MaC-Zellen zeigte, dass nach einer anfänglichen Co-Kultivierung von mindestens zwei Wochen der resistente Phänotyp über zumindest eine zusätzliche Woche in der erneuten Mono-Kultur tendenziell gehalten werden konnte, wenn er auch im Gegensatz zur Co-Kultur nicht statistisch signifikant war. In einigen Versuchen blieb zudem der resistente Phänotyp auch nach zwei Wochen erneuter Mono-Kultur erhalten [Daten nicht gezeigt].

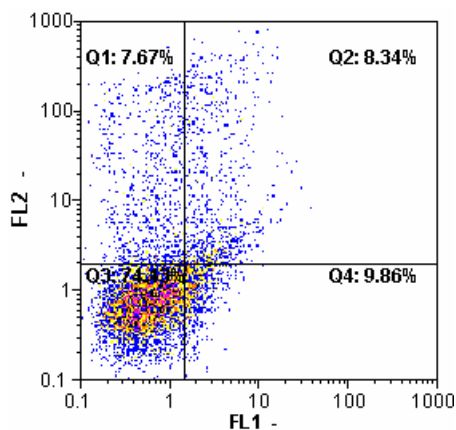
Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die in der Co-Kultur gewonnenen Eigenschaften bezüglich der Resistenz gegenüber einer Zytostatikabehandlung mit Etoposid für mindestens eine Woche über die Co-Kultur hinaus in Panc89-Zellen tendenziell erhalten bleiben.



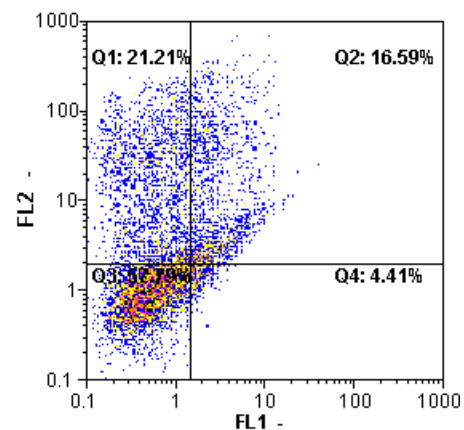
	A	PI	% Zellen
Q3: vital	-	-	79,95
Q4: frühapoptotisch	+	-	9,48
Q2: spätapoptotisch	+	+	3,87
Q1: nekrotisch	-	+	6,70

Abb. 4.5.A: *Panc89 Mono unbehandelt*

	A	PI	% Zellen
Q3: vital	-	-	22,56
Q4: frühapoptotisch	+	-	23,30
Q2: spätapoptotisch	+	+	39,47
Q1: nekrotisch	-	+	14,67

Abb. 4.5.B: *Panc89 Mono nach Behandlung mit 20µg/ml Etoposid für 24 h*

	A	PI	% Zellen
Q3: vital	-	-	74,13
Q4: frühapoptotisch	+	-	9,86
Q2: spätapoptotisch	+	+	8,34
Q1: nekrotisch	-	+	7,67

Abb. 4.5.C: *Panc89 Co unbehandelt*

	A	PI	% Zellen
Q3: vital	-	-	57,79
Q4: frühapoptotisch	+	-	4,41
Q2: spätapoptotisch	+	+	16,59
Q1: nekrotisch	-	+	21,21

Abb. 4.5.D: *Panc89 Co nach Behandlung mit 20µg/ml Etoposid für 24 h*

Abb. 4.5.: Beispiel von vier Messungen der Apoptoserate mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie und Auswertung mittels Flomax-Software

Die FL1-Achse stellt die grüne Fluoreszenz des Annexin V-FITC dar, die FL2-Achse die rote Fluoreszenz des PI. Mit Hilfe der dargestellten vier Quadranten wird der Anteil an vitalen, früh- und spätapoptotischen sowie nekrotischen Zellen jeweils vor und nach der Etoposidbehandlung von mono- und kokultivierten Panc89-Zellen bestimmt.

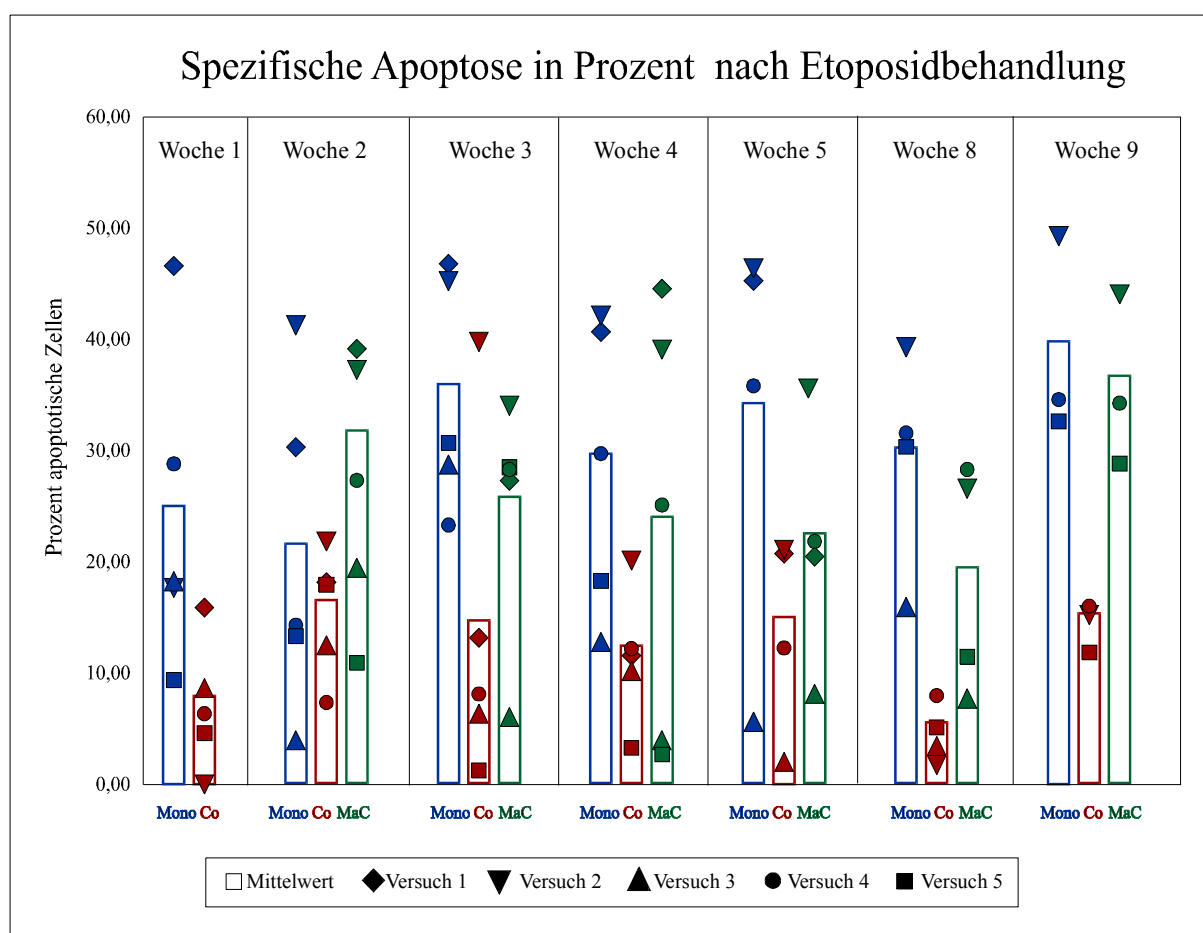


Abb. 4.6.: Spezifische Apoptose in Prozent nach Etoposidbehandlung (20µg/ml für 24h): Vergleich von Panc89-Zellen Mono (blau), Co (rot) und MaC (grün) im Verlauf mehrerer Wochen

Dargestellt sind fünf unabhängige mehrwöchige Versuchsdurchgänge durch verschiedene Symbole sowie deren Mittelwerte als farbige Balken.

Die Co-Kultur mit murinen Pankreasfibroblasten führt in Panc89-Zellen zu einer erniedrigten spezifischen Apoptoserate nach einer Zytostatikabehandlung mit Etoposid.

Tab. 4.1.: Spezifische Apoptose in Prozent nach Etoposidbehandlung (20µg/ml für 24h): Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen mehrwöchigen Versuchsdurchgängen von Panc89-Zellen Mono, Co und MaC

\* = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Panc89 Co-bzw. MaC-Zellen und dem Mittelwert der Panc89 Mono-Zellen ist statistisch signifikant mit  $p < 0,05$ .

# = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Panc89 Co- bzw. MaC-Zellen und dem Mittelwert der Panc89 Mono-Zellen ist statistisch nicht signifikant.

Mittelwert	1.Woche	2.Woche	3.Woche	4.Woche	5.Woche	8.Woche	9.Woche
Panc89 Mono	24,04	20,64	34,97	28,74	33,29	29,30	38,83
Panc89 Co	6,98 *	15,58 #	13,75 *	11,49 *	14,04 #	4,59 *	14,37 *
Panc89 MaC	—	30,83 #	24,84 #	23,08 #	21,59 #	18,52 #	35,72 #
Standard- abweichung	1.Woche	2.Woche	3.Woche	4.Woche	5.Woche	8.Woche	9.Woche
Panc89 Mono	14,11	14,91	10,46	13,09	19,03	9,73	9,10
Panc89 Co	6,07	5,66	15,17	6,00	8,97	2,67	2,21
Panc89 MaC	—	7,94	10,82	19,39	11,34	10,44	7,71

---

#### 4.3.2. NF- $\kappa$ B Status

Da bereits gezeigt werden konnte, dass eine erhöhte NF- $\kappa$ B Basalaktivität zur Chemoresistenz in Pankreaskarzinomzellen beitragen kann [Arlt et al. 2001] und dass der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B in 67-90% der Pankreaskarzinome konstitutiv aktiviert ist [Muerkoster et al. 2005; Wang et al. 1999], sollte mit Hilfe eines NF- $\kappa$ B ELISAs geklärt werden, ob Tumor-Stroma-Interaktionen zur Induktion der NF- $\kappa$ B Basalaktivität beitragen und sich somit der NF- $\kappa$ B Status der kokultivierten Panc89-Zellen von dem der monokultivierten Panc89-Zellen unterscheidet.

Zur Bestimmung von aktiviertem NF- $\kappa$ B mit Hilfe eines spezifischen ELISAs wurden Kernextrakte hergestellt wie unter Punkt 3.4.1.1. beschrieben. Nachdem deren Proteingehalt bestimmt wurde, ist der ELISA gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt worden. Die gemessene optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450nm ließ eine semiquantitative Aussage über die Menge des aktivierten NF- $\kappa$ B in der untersuchten Probe zu.

In der Abbildung 4.7. sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen mehrwöchigen Versuchsdurchgängen dargestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind zudem gesondert in der Tabelle 4.2. aufgeführt.

Die Basalaktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B war in den kokultivierten Panc89-Zellen gegenüber den monokultivierten Panc89-Zellen mit Ausnahme der fünften Woche moderat erhöht; jedoch waren die vorhandenen Unterschiede statistisch nicht signifikant. Die Level an aktiviertem NF- $\kappa$ B lagen in den MaC-Zellen mit Ausnahme der neunten Woche unter denen der Mono-Zellen.

Diese Daten zeigen, dass Tumor-Stroma-Interaktionen über einen langen Zeitraum zu einer mäßigen aber nicht signifikanten Induktion der NF- $\kappa$ B Basalaktivität in Panc89-Zellen beitragen.



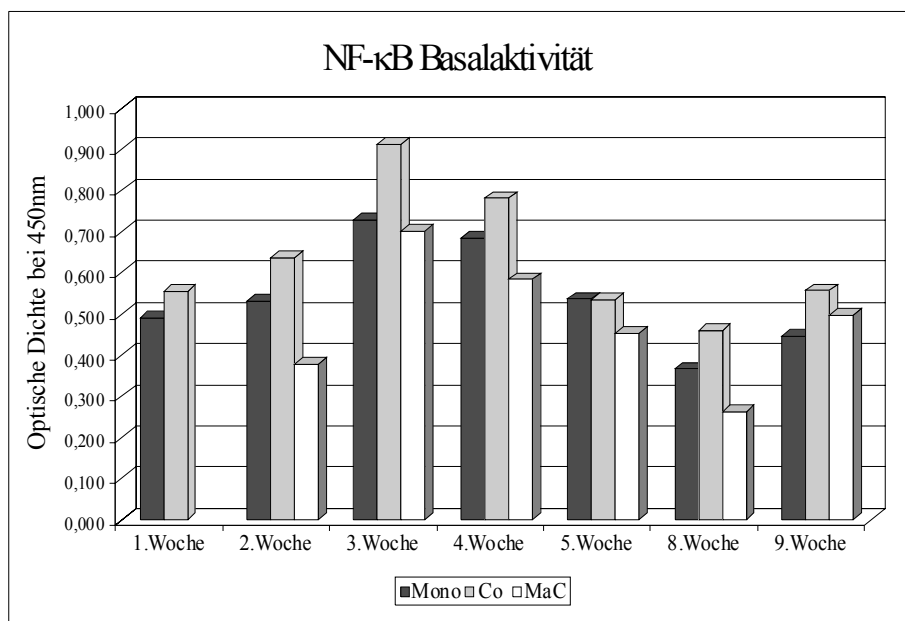


Abb. 4.7.: NF-κB Basalaktivität dargestellt als optische Dichte bei 450nm: Mittelwerte aus fünf unabhängigen mehrwöchigen Versuchsdurchgängen: Vergleich von Panc89-Zellen Mono, Co und MaC

In kokultierten Panc89-Zellen ist eine moderate aber statistisch nicht signifikante Induktion der NF-κB Basalaktivität zu beobachten.

Tab. 4.2.: NF-κB Basalaktivität dargestellt als optische Dichte bei 450nm: Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen mehrwöchigen Versuchsdurchgängen: Vergleich von Panc89-Zellen Mono, Co und MaC

# = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Panc89 Co- bzw. MaC-Zellen und dem Mittelwert der Panc89 Mono-Zellen ist statistisch nicht signifikant.

Mittelwert	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	8. Woche	9. Woche
Panc89 Mono	0,49	0,53	0,73	0,69	0,54	0,37	0,45
Panc89 Co	0,56 #	0,64 #	0,91 #	0,78 #	0,54 #	0,46 #	0,56 #
Panc89 MaC	—	0,38 #	0,70 #	0,58 #	0,45 #	0,26 #	0,50 #
Standard-abweichung	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	8. Woche	9. Woche
Panc89 Mono	0,13	0,35	0,54	0,53	0,36	0,21	0,28
Panc89 Co	0,23	0,44	0,47	0,67	0,24	0,32	0,39
Panc89 MaC	—	0,20	0,45	0,38	0,25	0,13	0,31

### 4.3.3. IL1 $\beta$ -Sekretion

IL1 $\beta$  kann in einem autokrinen Regelkreis NF- $\kappa$ B Aktivität induzieren und darüber zu Chemoresistenz in Pankreaskarzinomzellen führen [Arlt et al. 2002]. In einem einwöchigen Co-Kulturmodell konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Pankreaskarzinomzellen mit Stromazellen zu einer Induktion eines autokrinen IL1 $\beta$ -Regelkreises führt, der eine Erhöhung der NF- $\kappa$ B Basalaktivität einschließt und in einem chemoresistenten Phänotyp resultiert [Muerkoster et al. 2004].

Die IL1 $\beta$ -Sekretion von kokultivierten Panc89-Zellen im Vergleich zu monokultivierten Panc89-Zellen sollte in dieser Arbeit im Verlauf mehrerer Wochen mittels eines IL1 $\beta$ -ELISAs untersucht werden. In der Abbildung 4.8. sind die Mittelwerte der IL1 $\beta$ -Sekretion in pg/10<sup>5</sup> Zellen aus vier (Wochen 1 und 2) bzw. zwei (Wochen 3, 5 und 6) unabhängigen mehrwöchigen Versuchsdurchgängen dargestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind zudem gesondert in der Tabelle 4.3. aufgeführt.

In der ersten Woche der mehrwöchigen Kultur wurden von den monokultivierten Panc89-Zellen 0,159 pg IL1 $\beta$  pro 10<sup>5</sup> Zellen und von den kokultivierten Panc89-Zellen 0,243 pg IL1 $\beta$  pro 10<sup>5</sup> Zellen sezerniert. In der ersten Woche wurde somit in den kokultivierten Panc89-Zellen eine erhöhte Menge des Zytokins IL1 $\beta$  sezerniert. Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. In den folgenden Wochen sank die IL1 $\beta$ -Sekretion der kokultivierten Tumorzellen unter das Niveau der monokultivierten Tumorzellen. Die Sekretion von IL1 $\beta$  der MaC-Zellen war durchweg niedriger als die der monokultivierten Panc89-Zellen.

Murines -von den Fibroblasten sezerniertes- IL1 $\beta$  konnte in einem für murines IL1 $\beta$  spezifischen ELISA nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass eine leicht erhöhte Sekretion von IL1 $\beta$  durch die kokultivierten Panc89-Zellen, die allerdings statistisch nicht signifikant ist, nur in der ersten Woche der Co-Kultur besteht.

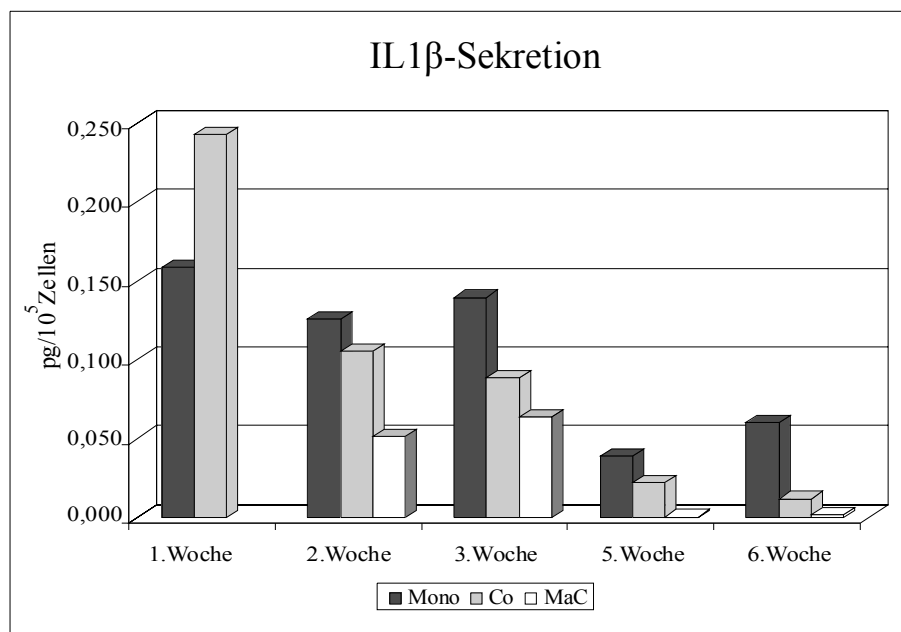


Abb. 4.8.: *IL1 $\beta$ -Sekretion dargestellt in pg/10<sup>5</sup>Zellen: Mittelwerte aus vier (Wochen 1 und 2) bzw. zwei (Wochen 3, 5 und 6) unabhängigen mehrwöchigen Versuchsdurchgängen: Vergleich von Panc89-Zellen Mono, Co und MaC*

Die Sekretion von IL1 $\beta$  ist in kokultivierten Panc89-Zellen in der ersten Woche der Co-Kultur tendenziell erhöht.

Tab. 4.3.: *IL1 $\beta$ -Sekretion dargestellt in pg/10<sup>5</sup>Zellen: Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier (Wochen 1 und 2) bzw. zwei (Wochen 3, 5 und 6) unabhängigen mehrwöchigen Versuchsdurchgängen: Vergleich von Panc89-Zellen Mono, Co und MaC*

# = Die Erhöhung des Mittelwertes der Panc89 Co-Zellen gegenüber des Mittelwertes der Panc89 Mono-Zellen ist statistisch nicht signifikant.

Mittelwert	1. Woche	2. Woche	3. Woche	5. Woche	6. Woche
Panc89 Mono	0,159	0,126	0,140	0,039	0,060
Panc89 Co	0,243 #	0,105	0,089	0,022	0,012
Panc89 MaC	—	0,051	0,064	0,001	0,002
Standard- abweichung	1. Woche	2. Woche	3. Woche	5. Woche	6. Woche
Panc89 Mono	0,098	0,069	0,056	0,003	0,023
Panc89 Co	0,073	0,064	0,122	0,010	0,017
Panc89 MaC	—	0,010	0,034	0,001	0,000

Der Mechanismus der frühen Resistenz über NF- $\kappa$ B und IL1 $\beta$  kann die über mehrere Wochen zu beobachtende erniedrigte Apoptoserate in kokultivierten Panc89-Zellen alleine nicht erklären, da die Sekretion von IL1 $\beta$  durch die kokultivierten Panc89-Zellen bereits ab der zweiten Woche unter dem Niveau der monokultivierten Panc89-Zellen lag. Der über Wochen aufrecht erhaltenen Apoptoseresistenz muss demnach ein anderer Mechanismus zugrunde liegen. Der Schwerpunkt der Experimente zur Aufklärung des gesuchten Mechanismus wurde auf die Caspasen gelegt, da diese Enzyme wichtige Schaltstellen der Apoptose darstellen.

#### 4.3.4. Procaspase-Expression und Caspase-Aktivierung

Apoptotische Signalwege münden in der Aktivierung von Caspasen. Da sie zentrale Enzyme der Apoptose sind, unterliegen ihre Expression und Aktivierung einer genauen Regulation.

##### 4.3.4.1. Procaspase-Expression auf Proteinebene

Die Expressionslevel der Proenzyme der Initiator-Caspasen 8 und 9 sowie der Effektor-Caspasen 3 und 7 wurden mittels Western Blot Analyse untersucht. In den Abbildungen 4.9.A bis 4.9.D sind die Wochen 1-4 und 9 eines repräsentativen Versuchsdurchganges dargestellt, von denen insgesamt fünf durchgeführt wurden. Die Detektion von HSP90 diene als Ladekontrolle.

Nach der ersten Woche der Co-Kultur zeigten sich zwischen mono- und kokultivierten Panc89-Zellen noch keine Unterschiede hinsichtlich der Expression der Procaspasen. Erst nach einer mindestens zweiwöchigen Co-Kultur lagen die Expressionslevel der Initiator-Caspasen 8 und 9 sowie der Effektor-Caspasen 3 und 7 in kokultivierten Panc89-Zellen unter dem Level der monokultivierten Panc89-Zellen. Die Abnahme der Expression der Initiator-Caspasen 8 und 9 war zudem mit der Dauer der Co-Kultur progredient. In den Panc89 MaC-Zellen war in der überwiegenden Zahl der Fälle gegenüber den Mono-Zellen ebenfalls eine verminderte Expression der Procaspasen auf Proteinebene zu sehen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Panc89-Zellen nach einer mindestens zweiwöchigen Co-Kultur durch die Präsenz der Pankreasfibroblasten weniger Procaspase 8, 9, 3 und 7 exprimieren.

##### Procaspase 8

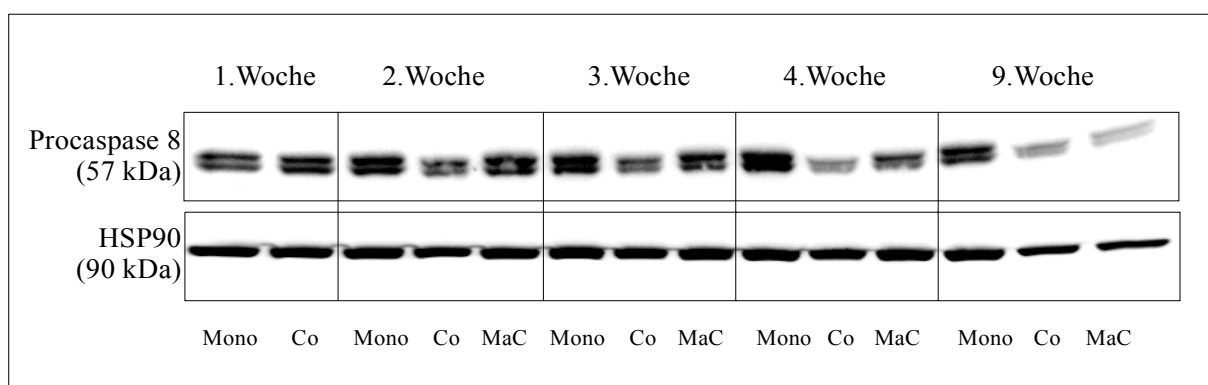


Abb. 4.9.A: Western Blot zur Detektion von Procaspase 8: Vergleich von Panc89-Zellen Mono, Co und MaC im Verlauf mehrerer Wochen

Die Expression der Procaspase 8 ist auf Proteinebene in kokultivierten Panc89-Zellen ab der zweiten Woche der Co-Kultur vermindert.

### Procaspase 9

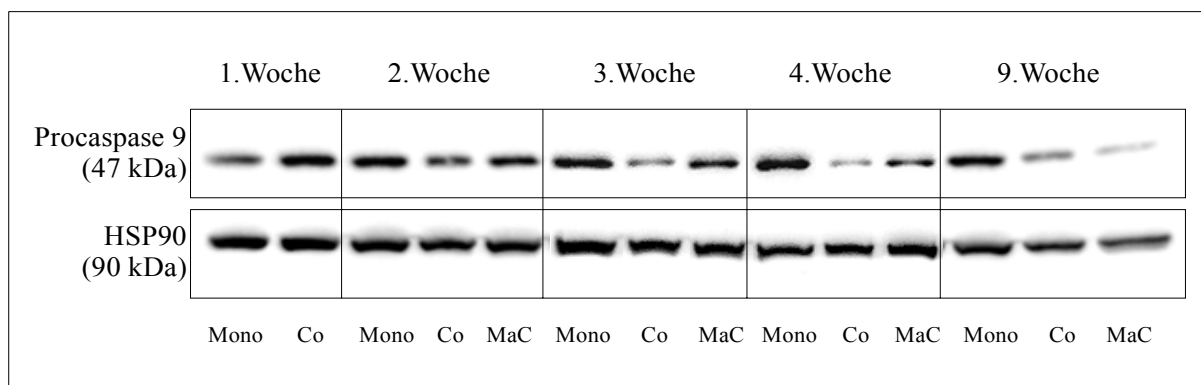


Abb. 4.9.B: *Western Blot zur Detektion von Procaspase 9: Vergleich von Panc89-Zellen Mono, Co und MaC im Verlauf mehrerer Wochen*

Die Expression der Procaspase 9 ist auf Proteinebene in kokultivierten Panc89-Zellen ab der zweiten Woche der Co-Kultur vermindert.

### Procaspase 3

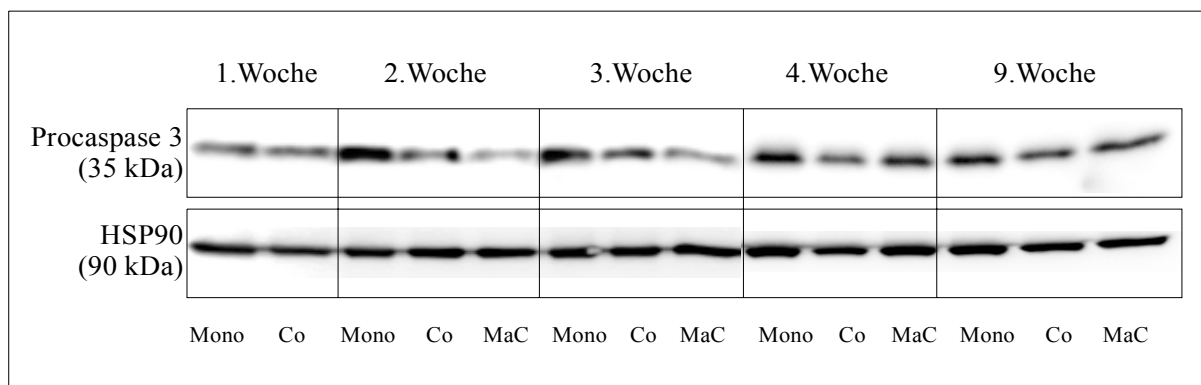


Abb. 4.9.C: *Western Blot zur Detektion von Procaspase 3: Vergleich von Panc89-Zellen Mono, Co und MaC im Verlauf mehrerer Wochen*

Die Expression der Procaspase 3 ist auf Proteinebene in kokultivierten Panc89-Zellen ab der zweiten Woche der Co-Kultur vermindert.

### Procaspase 7

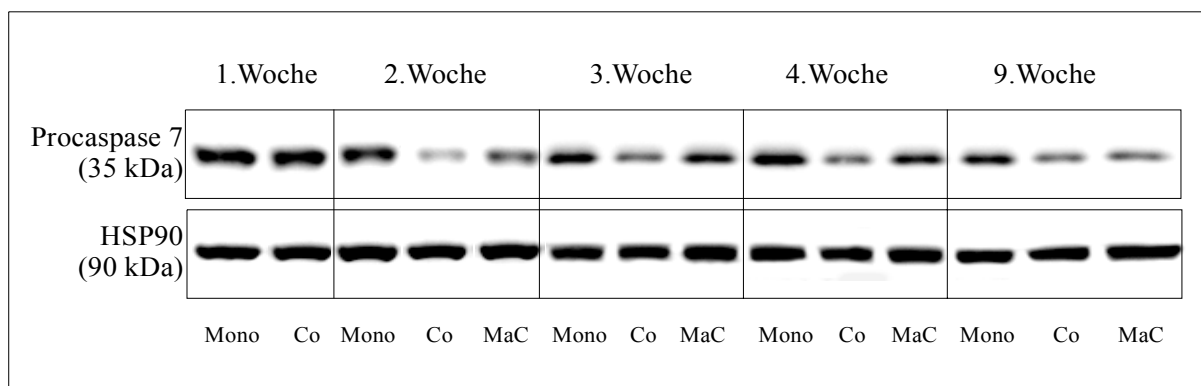


Abb. 4.9.D: *Western Blot zur Detektion von Procaspase 7: Vergleich von Panc89-Zellen Mono, Co und MaC im Verlauf mehrerer Wochen*

Die Expression der Procaspase 7 ist auf Proteinebene in kokultivierten Panc89-Zellen ab der zweiten Woche der Co-Kultur vermindert.

#### 4.3.4.2. Caspase-Aktivierung

Der Anteil der aktivierten Caspase nach Apoptoseinduktion mit Etoposid wurde für die Caspasen 8, 9, 3 und 7 mittels Western Blot Analyse untersucht. Die Zellen wurden entweder unbehandelt belassen oder 24 Stunden vor der Aufarbeitung mit 20µg/ml Etoposid stimuliert. Die Abbildungen 4.10.A bis 4.10.C zeigen jeweils ein repräsentatives Ergebnis. Die aktivierte Form der Caspase 7 konnte vermutlich aufgrund einer mangelnden Sensitivität des Antikörpers nicht dargestellt werden. Es wurden insgesamt fünf Versuchsdurchgänge ausgewertet. Die Detektion von Tubulin diente als Ladekontrolle.

Die Western Blots wurden zudem densitometrisch ausgewertet, damit beurteilt werden konnte, ob sichtbare Unterschiede allein auf die verminderte Basalexpression der Procaspasen zurückzuführen waren oder ob von der erniedrigten Menge an Procaspasen in den kokultivierten Zellen auch anteilig weniger aktiviert wurde. Dazu wurde die aktivierte Caspase in ein Verhältnis zur Procaspase (unbehandelte Probe) gesetzt, so dass die verminderte Basalexpression bei der Bewertung keine Rolle spielte. Die densitometrische Auswertung der Western Blots zur Detektion von aktivierten Caspasen nach Etoposidbehandlung wird in Tabelle 4.4. als prozentualer Anteil der aktivierten Caspasen 8, 9 und 3 im Verhältnis zur jeweiligen Procaspase gezeigt.

Nach Apoptoseinduktion mit Etoposid wurden die Caspasen 8 und 9 in Panc89 Co- und MaC-Zellen und die Caspase 3 in den Panc89-Co-Zellen weniger aktiviert als in monokultivierten Panc89-Zellen. Sichtbar ist dieses an den schwächeren Banden der aktivierten Caspase in Ganzzelllysaten von Panc89 Co- und MaC-Zellen gegenüber denen der aktivierten Caspase in Ganzzelllysaten von Panc89 Mono-Zellen (siehe Abbildungen 4.10.A bis 4.10.C). Die densitometrische Auswertung zeigte, dass ein Unterschied besonders bei der Caspase 9 vorhanden war (siehe Tabelle 4.4.). Jedoch war dieser Unterschied weder bei der Caspase 9 noch bei den Caspase 8 und 3 statistisch signifikant. Das geringere Maß an Caspase-Aktivierung stellt daher vermutlich bei der Ausbildung von Chemoresistenz im Co-Kulturmodell einen untergeordneten Mechanismus dar, der am ehesten noch bei der Caspase 9 eine Rolle zu spielen scheint.

## Caspase 8

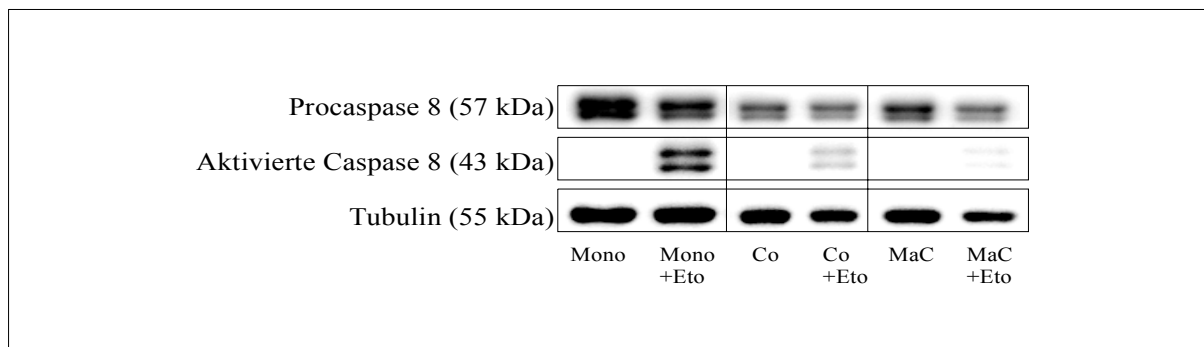


Abb. 4.10.A: *Western Blot zur Detektion von aktivierter Caspase 8: Vergleich von Panc89-Zellen Mono, Co und MaC nach Behandlung mit Etoposid (20µg/ml für 24h), Beispiel aus der vierten Woche einer Co-Kultur*

Die Aktivierung der Procaspase 8 ist auf Proteinebene in Panc89 Co und MaC-Zellen im Vergleich zu Mono-Zellen nicht signifikant vermindert.

## Caspase 9

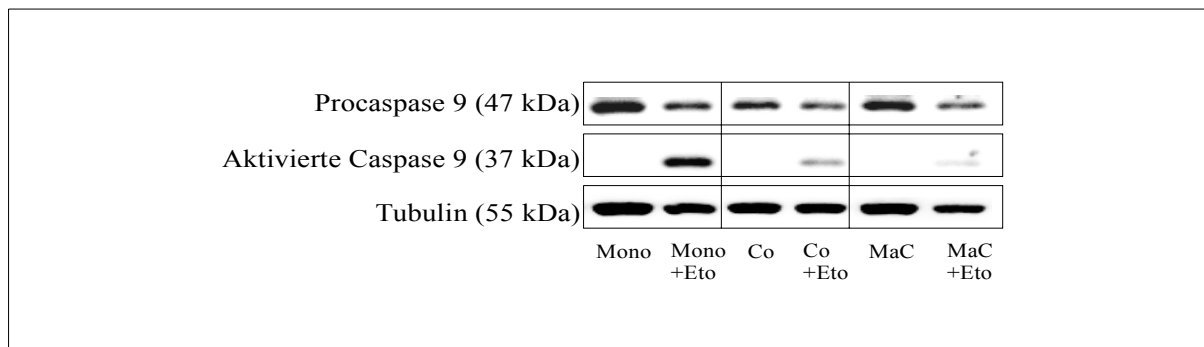


Abb. 4.10.B: *Western Blot zur Detektion von aktivierter Caspase 9: Vergleich von Panc89-Zellen Mono, Co und MaC nach Behandlung mit Etoposid (20µg/ml für 24h), Beispiel aus der achten Woche einer Co-Kultur*

Die Aktivierung der Procaspase 9 ist auf Proteinebene in Panc89 Co und MaC-Zellen im Vergleich zu Mono-Zellen nicht signifikant vermindert.

## Caspase 3

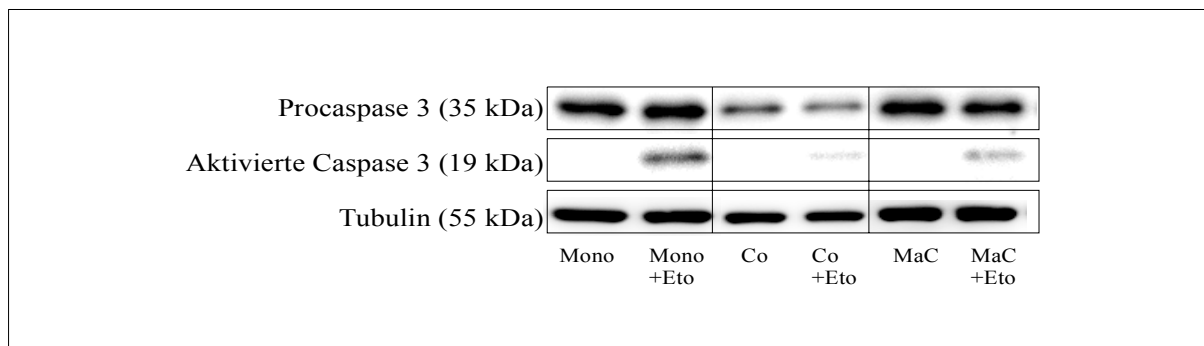


Abb. 4.10.C: *Western Blot zur Detektion von aktivierter Caspase 3: Vergleich von Panc89-Zellen Mono, Co und MaC nach Behandlung mit Etoposid (20µg/ml für 24h), Beispiel aus der vierten Woche einer Co-Kultur*

Die Aktivierung der Procaspase 3 ist auf Proteinebene in Panc89 Co und MaC-Zellen im Vergleich zu Mono-Zellen nicht signifikant vermindert.

Tab. 4.4.: *Densitometrische Auswertung der Western Blots zur Detektion von aktivierten Caspasen nach Etoposidbehandlung (20µg/ml für 24h): prozentualer Anteil der aktivierten Caspasen 8, 9 und 3 im Verhältnis zur jeweiligen Procaspase, Vergleich von Panc89 Mono-, Co- und MaC-Zellen*

Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Panc89-Mono-Zellen zu den Mittelwerten der Panc89-Co- und der Panc89-MaC-Zellen ist für keine Caspase statistisch signifikant.

	Aktivierte Caspase 8 in Prozent (n=14 Blots)			Aktivierte Caspase 9 in Prozent (n=11 Blots)			Aktivierte Caspase 3 in Prozent (n=6 Blots)		
	Mono	Co	MaC	Mono	Co	MaC	Mono	Co	MaC
Mittelwert	24,00	20,29	13,09	34,45	17,36	14,78	6,67	4,33	7,00
Standardabweichung	12,66	12,69	11,32	30,47	19,60	13,00	2,66	1,63	7,53

#### 4.3.4.3. Expression der Caspase-Inhibitoren cIAP1, cIAP2 und XIAP

Sowohl die Aktivierung als auch die enzymatische Aktivität der Caspasen 3, 7 und 9 können durch die Mitglieder der IAP-Familie cIAP1, cIAP2 und XIAP gehemmt werden. Zusätzlich können Caspasen durch Mitglieder der IAP-Familie ubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt werden [Friedman and Xue 2004; Riedl and Shi 2004].

Zur Überprüfung, ob diese endogenen Caspase-Inhibitoren in die verringerte Expression und Aktivierung der Procaspasen in kokultivierten Panc89-Zellen involviert sind, wurden die Expressionslevel der genannten Proteine der IAP-Familie mittels Western Blot Analyse untersucht. Die Abbildungen 4.12.A bis 4.12.C zeigen verschiedene Wochen eines repräsentativen Versuchsdurchganges, von denen insgesamt fünf durchgeführt wurden. Die Detektion von HSP90 oder Tubulin diente als Ladekontrolle.

Die Co-Kultur mit murinen Pankreasfibroblasten hatte keinen Einfluss auf die Expression von cIAP1 und XIAP in Panc89-Zellen. Die Expression von cIAP2 wurde durch die Co-Kultur in den untersuchten Wochen sogar verringert. Somit ist festzustellen, dass die genannten Mitglieder der IAP-Familie für die erniedrigte Expression der Procaspasen sowie für die geringgradig verminderte Aktivierung der Caspasen offenbar keine maßgebliche Rolle spielen.



## cIAP1

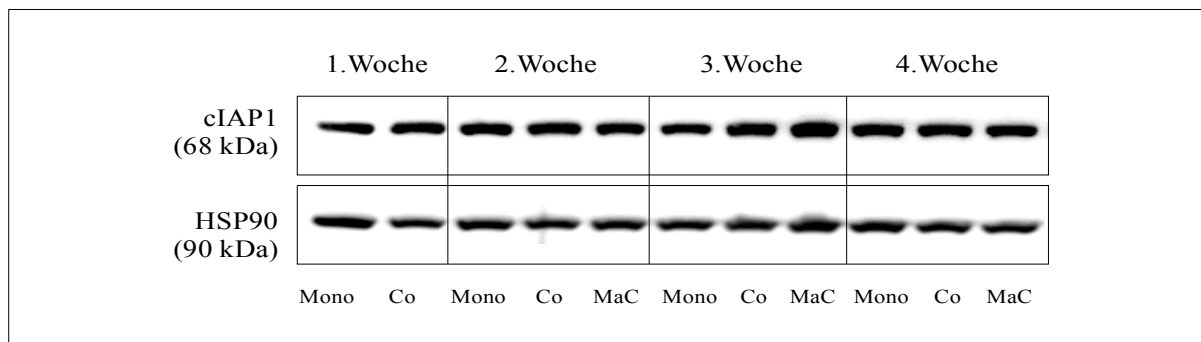


Abb. 4.12.A: *Western Blot zur Detektion von cIAP1: Vergleich von Panc89-Zellen Mono, Co und MaC*

Der endogene Caspase-Inhibitor cIAP1 wird durch die Co-Kultur nicht beeinflusst.

## cIAP2

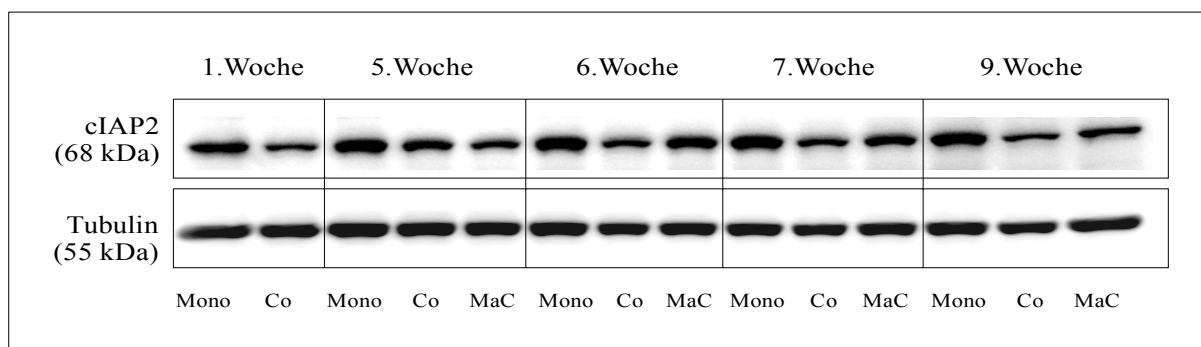


Abb. 4.12.B: *Western Blot zur Detektion von cIAP2: Vergleich von Panc89-Zellen Mono, Co und MaC*

Der endogene Caspase-Inhibitor cIAP2 wird durch die Co-Kultur erniedrigt.

## XIAP

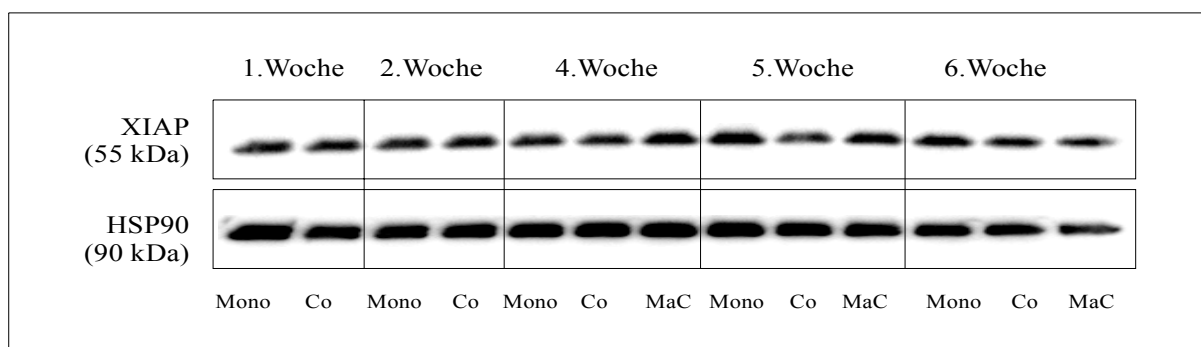


Abb. 4.12.C: *Western Blot zur Detektion von XIAP: Vergleich von Panc89-Zellen Mono, Co und MaC*

Der endogene Caspase-Inhibitor XIAP wird durch die Co-Kultur nicht beeinflusst.

#### 4.3.4.4. Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 nach Behandlung der Zellen mit dem Proteasominhibitors MG132

Caspasen werden wie viele andere regulative Proteine durch den proteasomalen Abbau gesteuert [Friedman and Xue 2004]. Eine mögliche Erklärung für die verringerte Menge verschiedener Procaspasen in den Panc89 Co- und MaC-Zellen kann daher in einem vermehrten Abbau der Caspasen durch das Proteasom liegen. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen oder sechs Stunden vor der Aufarbeitung mit dem Proteasominhibitor MG132 in einer Endkonzentration von 5,25µM behandelt. Die Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 wurde mittels Western Blot Analyse untersucht. In den Abbildungen 4.11.A bis 4.11.D ist jeweils eine repräsentative Woche eines Versuchsdurchganges dargestellt, von denen insgesamt fünf durchgeführt wurden. Die Detektion von Tubulin diente als Ladekontrolle.

Durch die Hemmung des proteasomalen Abbaus mittels MG132 konnte bei keiner der untersuchten Caspasen das erniedrigte Niveau der Panc89 Co- und MaC-Zellen auf das der monokultivierten Panc89-Zellen angehoben werden.

Der proteasomale Abbau scheint daher in diesem System nicht für die verringerte Menge an Procaspasen in Panc89 Co- und MaC-Zellen verantwortlich zu sein.

#### Procaspase 8

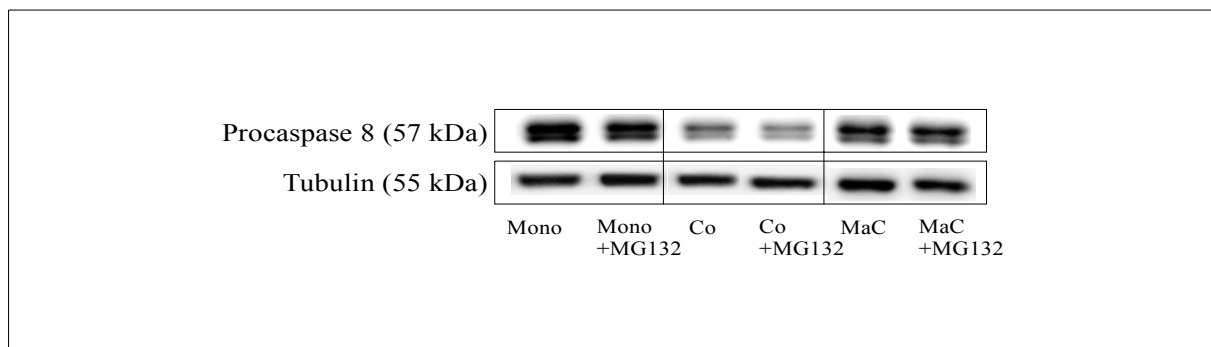


Abb. 4.11.A: *Western Blot zur Detektion von Procaspase 8: Vergleich von unbehandelten und mit dem Proteasominhibitor MG132 (5,25µM) behandelten Panc89-Zellen Mono, Co und MaC, Beispiel aus der vierten Woche einer Co-Kultur*

Die in der Co-Kultur erniedrigten Level der Procaspase 8 werden durch den Proteasominhibitor MG132 nicht aufgehoben.

### Procaspase 9

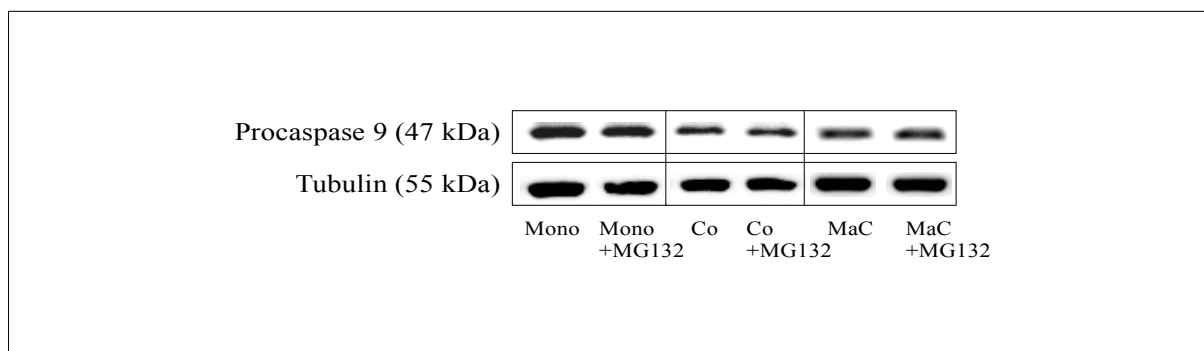


Abb. 4.11.B: *Western Blot zur Detektion von Procaspase 9: Vergleich von unbehandelten und mit dem Proteasominhibitor MG132 (5,25µM) behandelten Panc89-Zellen Mono, Co und MaC, Beispiel aus der vierten Woche einer Co-Kultur*

Die in der Co-Kultur erniedrigten Level der Procaspase 9 werden durch den Proteasom-inhibitor MG132 nicht aufgehoben.

### Procaspase 3

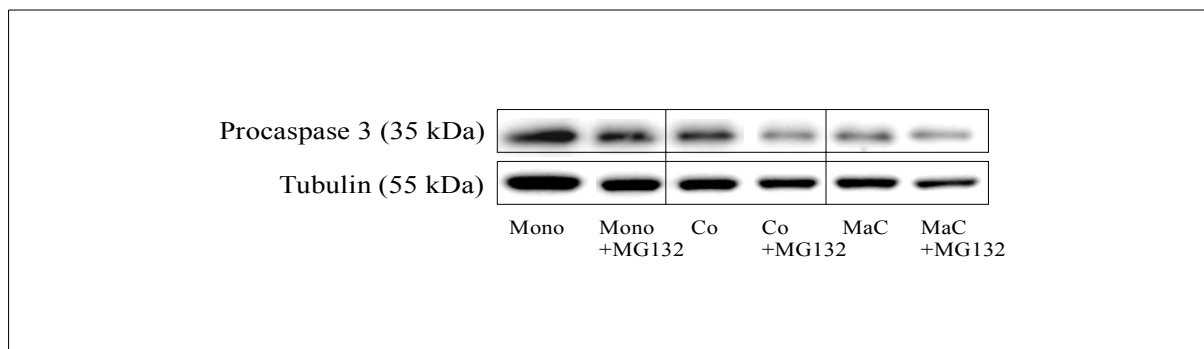


Abb. 4.11.C: *Western Blot zur Detektion von Procaspase 3: Vergleich von unbehandelten und mit dem Proteasominhibitor MG132 (5,25µM) behandelten Panc89-Zellen Mono, Co und MaC, Beispiel aus der vierten Woche einer Co-Kultur*

Die in der Co-Kultur erniedrigten Level der Procaspase 3 werden durch den Proteasom-inhibitor MG132 nicht aufgehoben.

### Procaspase 7

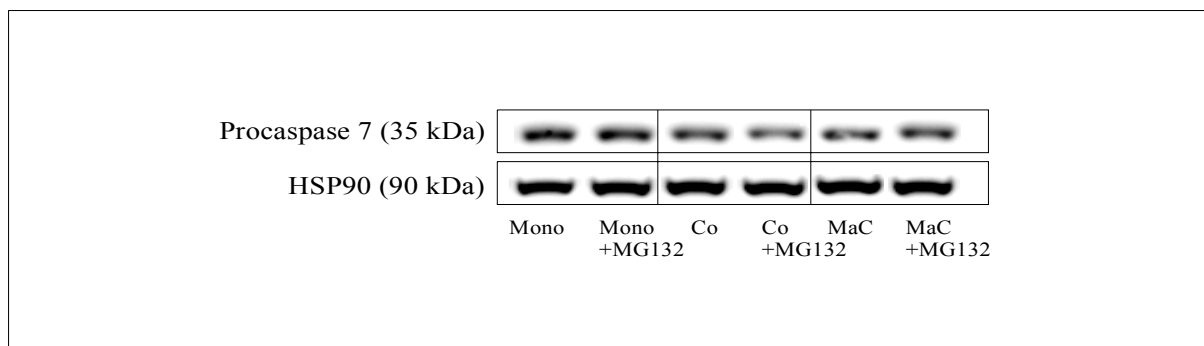


Abb. 4.11.D: *Western Blot zur Detektion von Procaspase 7: Vergleich von unbehandelten und mit dem Proteasominhibitor MG132 (5,25µM) behandelten Panc89-Zellen Mono, Co und MaC, Beispiel aus der vierten Woche einer Co-Kultur*

Die in der Co-Kultur erniedrigten Level der Procaspase 7 werden durch den Proteasom-inhibitor MG132 nicht aufgehoben.

#### 4.3.5. Procaspase-Expression auf RNA-Ebene

Die verringerten Expressionslevel der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 scheinen nicht durch die endogenen Caspase-Inhibitoren der IAP-Familie bzw. eine erhöhte proteasomale Degradation bedingt zu sein. Da die Ursache der verminderten Procaspase-Level in kokultivierten Panc89-Zellen daher vermutlich nicht auf Proteinebene liegt, wurde die Caspase-Expression auch auf transkriptioneller Ebene untersucht. Dazu wurde die Caspase-Expression auf mRNA-Ebene mittels Reverser Transkription und anschließender Realtime-PCR überprüft. Die Menge an mRNA in den kokultivierten Panc89-Zellen wurde ins Verhältnis zur mRNA-Menge der monokultivierten Panc89-Zellen gesetzt, die als 1 festgelegt wurde. Zuvor sind beide Messgrößen auf  $\beta$ -Aktin als ein *“housekeeping“* Gen normalisiert worden. Folgende Formel fand dabei Anwendung:

$$x = 2^{y1-y2}/2^{z1-z2}$$

y1 = Cyclezahl Referenzprobe gesuchtes Gen

y2 = Cyclezahl zu messende Probe gesuchtes Gen

z1 = Cyclezahl Referenz *“housekeeping“* Gen ( $\beta$ -Aktin)

z2 = Cyclezahl zu messende Probe *“housekeeping“* Gen ( $\beta$ -Aktin)

Das Ergebnis x gibt den Faktor an, wieviel mehr ( $x > 1$ ) oder weniger ( $x < 1$ ) Ausgangskopien von dem gesuchten DNA-Abschnitt in der zu messenden Probe vorhanden sind, um wieviel sich also die mRNA-Menge in den kokultivierten Zellen von der mRNA-Menge der monokultivierten Zellen unterscheidet. Die Proben stammten aus mindestens zwei unabhängigen Versuchsdurchgängen und wurden zweimal jeweils in Doppelwerten gemessen. Gezeigt sind in den Abbildungen 4.13.A bis 4.13.D die Mittelwerte des Faktors x für die Caspasen 8, 9, 3 und 7 aus den Wochen 1 bis 5. In den Tabellen 4.5.A bis 4.5.D sind die Mittelwerte und Standardabweichungen zudem gesondert aufgeführt.

Die Menge an mRNA für die Caspasen 8, 9, 3 und 7 war in kokultivierten Panc89-Zellen im Verhältnis zu monokultivierten Panc89-Zellen reduziert. Dabei schien die mRNA-Menge in der Co-Kultur im Verlauf der Wochen abzunehmen.

Festzuhalten ist, dass bereits ab der ersten Woche in Co-Kultur mit murinen Pankreasfibroblasten in Panc89-Zellen erniedrigte mRNA-Level an Procaspase 8, 9, 3 und 7 zu beobachten sind, so dass angenommen werden kann, dass die nachfolgend verringerte Expression der Procaspasen auf Proteinebene durch einer verminderte Transkription der betreffenden Gene bedingt wird.

## Procaspase 8

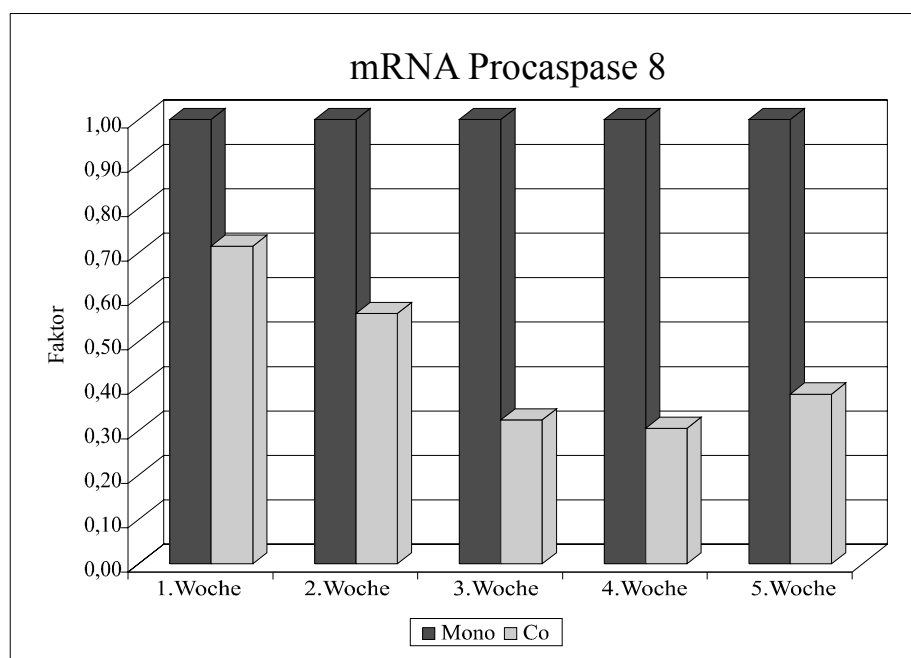


Abb. 4.13.A: Procaspase 8: Verhältnis der mRNA-Mengen in mono- und kokultivierten Panc89-Zellen über einen Zeitraum von fünf Wochen

Die Proben stammten aus mindestens zwei unabhängigen Versuchsdurchgängen und wurden zweimal jeweils in Doppelwerten gemessen. Die Menge an mRNA in den kokultivierten Panc89-Zellen wurde ins Verhältnis zur mRNA-Menge der monokultivierten Panc89-Zellen gesetzt, die als 1 festgelegt wurde. Zuvor sind beide Messgrößen auf  $\beta$ -Aktin als ein "housekeeping" Gen normalisiert worden.

Die Expression der Procaspase 8 auf mRNA-Ebene ist in kokultivierten Panc89-Zellen gegenüber monokultivierten Panc89-Zellen ab der dritten Woche statistisch signifikant vermindert.

Tab. 4.5.A: Mittelwerte und Standardabweichungen für Procaspase 8: Verhältnis der mRNA-Mengen in mono- und kokultivierten Panc89-Zellen über einen Zeitraum von fünf Wochen

\* = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Panc89 Co-Zellen und dem Mittelwert der Panc89 Mono-Zellen ist statistisch signifikant mit  $p < 0,04$ .

# = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Panc89 Co-Zellen und dem Mittelwert der Panc89 Mono-Zellen ist statistisch nicht signifikant.

Mittelwert	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche
Panc89 Mono	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Panc89 Co	0,72 #	0,56 #	0,32 *	0,31 *	0,38 *
Standard- abweichung	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche
Panc89 Mono	—	—	—	—	—
Panc89 Co	0,19	0,31	0,25	0,19	0,23

## Procaspase 9

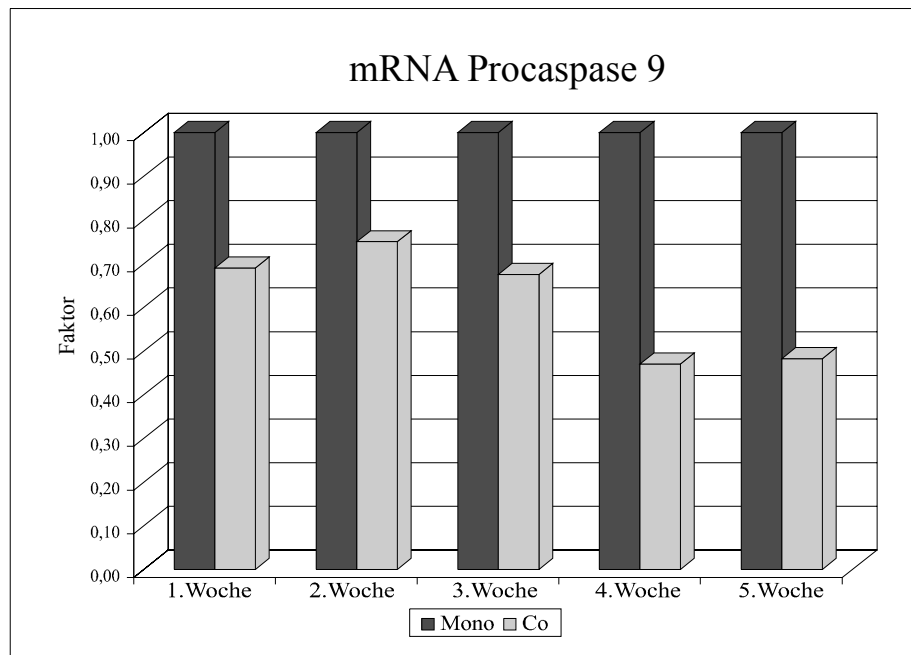


Abb. 4.13.B: Procaspase 9: Verhältnis der mRNA-Mengen in mono- und kokultivierten Panc89-Zellen über einen Zeitraum von fünf Wochen

Die Proben stammten aus mindestens zwei unabhängigen Versuchsdurchgängen und wurden zweimal jeweils in Doppelwerten gemessen. Die Menge an mRNA in den kokultivierten Panc89-Zellen wurde ins Verhältnis zur mRNA-Menge der monokultivierten Panc89-Zellen gesetzt, die als 1 festgelegt wurde. Zuvor sind beide Messgrößen auf  $\beta$ -Aktin als ein "housekeeping" Gen normalisiert worden.

Die Expression der Procaspase 9 auf mRNA-Ebene ist in kokultivierten Panc89-Zellen gegenüber monokultivierten Panc89-Zellen in der zweiten, vierten und fünften Woche statistisch signifikant vermindert.

Tab. 4.5.B: Mittelwerte und Standardabweichungen für Procaspase 9: Verhältnis der mRNA-Mengen in mono- und kokultivierten Panc89-Zellen über einen Zeitraum von fünf Wochen

\* = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Panc89 Co-Zellen und dem Mittelwert der Panc89 Mono-Zellen ist statistisch signifikant mit  $p < 0,04$ .

# = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Panc89 Co-Zellen und dem Mittelwert der Panc89 Mono-Zellen ist statistisch nicht signifikant.

Mittelwert	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche
Panc89 Mono	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Panc89 Co	0,69 #	0,75 *	0,68 #	0,47 *	0,48 *
Standard- abweichung	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche
Panc89 Mono	—	—	—	—	—
Panc89 Co	0,37	0,01	0,28	0,01	0,28

## Procaspase 3

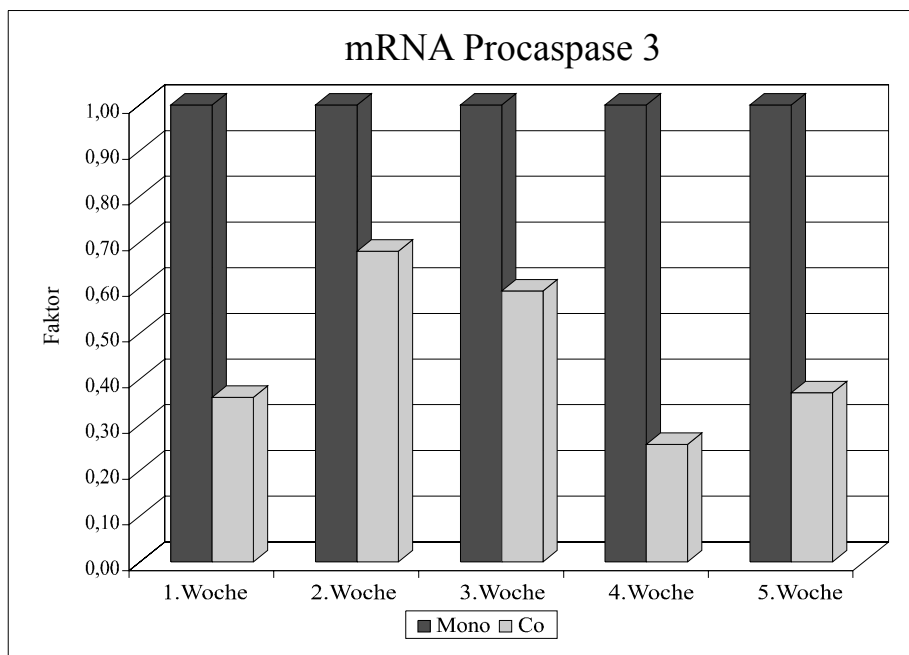


Abb. 4.13.C: Procaspase 3: Verhältnis der mRNA-Mengen in mono- und kokultivierten Panc89-Zellen über einen Zeitraum von fünf Wochen

Die Proben stammten aus mindestens zwei unabhängigen Versuchsdurchgängen und wurden zweimal jeweils in Doppelwerten gemessen. Die Menge an mRNA in den kokultivierten Panc89-Zellen wurde ins Verhältnis zur mRNA-Menge der monokultivierten Panc89-Zellen gesetzt, die als 1 festgelegt wurde. Zuvor sind beide Messgrößen auf  $\beta$ -Aktin als ein "housekeeping" Gen normalisiert worden.

Die Expression der Procaspase 3 auf mRNA-Ebene ist in kokultivierten Panc89-Zellen gegenüber monokultivierten Panc89-Zellen ab der dritten Woche statistisch signifikant vermindert.

Tab. 4.5.C: Mittelwerte und Standardabweichungen für Procaspase 3: Verhältnis der mRNA-Mengen in mono- und kokultivierten Panc89-Zellen über einen Zeitraum von fünf Wochen

\* = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Panc89 Co-Zellen und dem Mittelwert der Panc89 Mono-Zellen ist statistisch signifikant mit  $p < 0,04$ .

# = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Panc89 Co-Zellen und dem Mittelwert der Panc89 Mono-Zellen ist statistisch nicht signifikant.

Mittelwert	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche
Panc89 Mono	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Panc89 Co	0,36 #	0,68 #	0,59 *	0,26 *	0,37 *
Standard- abweichung	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche
Panc89 Mono	—	—	—	—	—
Panc89 Co	0,11	0,45	0,08	0,16	0,17

## Procaspase 7

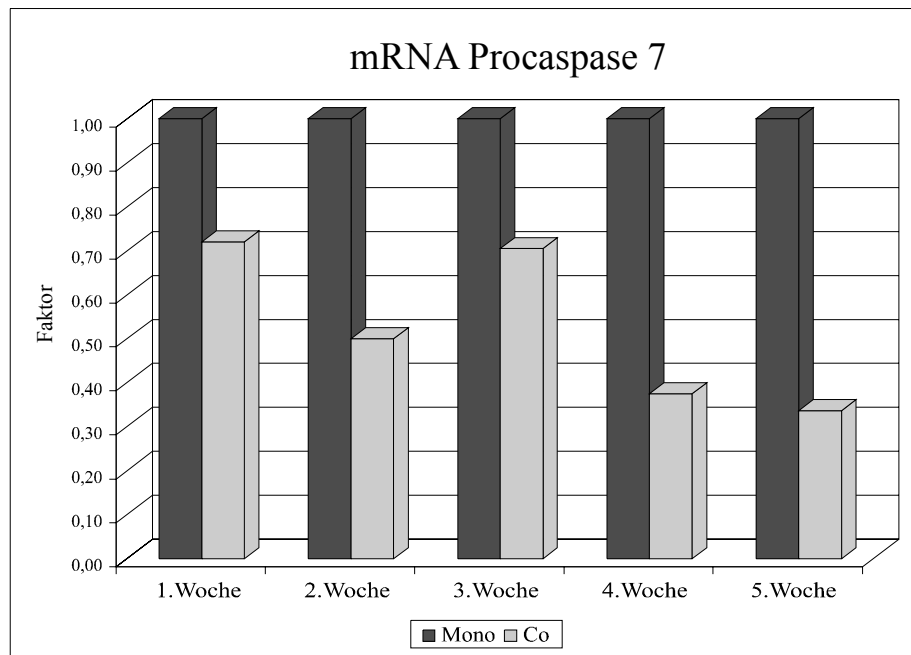


Abb. 4.13.D: Procaspase 7: Verhältnis der mRNA-Mengen in mono- und kokultivierten Panc89-Zellen über einen Zeitraum von fünf Wochen

Die Proben stammten aus mindestens zwei unabhängigen Versuchsdurchgängen und wurden zweimal jeweils in Doppelwerten gemessen. Die Menge an mRNA in den kokultivierten Panc89-Zellen wurde ins Verhältnis zur mRNA-Menge der monokultivierten Panc89-Zellen gesetzt, die als 1 festgelegt wurde. Zuvor sind beide Messgrößen auf  $\beta$ -Aktin als ein "housekeeping" Gen normalisiert worden.

Die Expression der Procaspase 7 auf mRNA-Ebene ist in kokultivierten Panc89-Zellen gegenüber monokultivierten Panc89-Zellen in der fünften Woche statistisch signifikant vermindert.

Tab. 4.5.D: Mittelwerte und Standardabweichungen für Procaspase 7: Verhältnis der mRNA-Mengen in mono- und kokultivierten Panc89-Zellen über einen Zeitraum von fünf Wochen

\* = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Panc89 Co-Zellen und dem Mittelwert der Panc89 Mono-Zellen ist statistisch signifikant mit  $p < 0,04$ .

# = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Panc89 Co-Zellen und dem Mittelwert der Panc89 Mono-Zellen ist statistisch nicht signifikant.

Mittelwert	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche
Panc89 Mono	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Panc89 Co	0,72 #	0,50 #	0,71 #	0,38 #	0,34 *
Standard- abweichung	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche
Panc89 Mono	—	—	—	—	—
Panc89 Co	0,12	0,06	0,36	0,26	0,12



#### 4.3.6. Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 auf Proteinebene nach Behandlung der Zellen mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin

Epigenetische Regulationsmechanismen haben Einfluss auf die Expression eines Gens, ohne dessen DNA-Sequenz zu verändern. Ein möglicher Mechanismus ist die DNA-Hypermethylierung von Promotorregionen, durch die die Transkription des betreffenden Genabschnitts unterbunden wird, so dass das Genprodukt nicht hergestellt werden kann (sogenanntes “*gene silencing*“). Durch den Einsatz des DNA-Methylierungsinhibitors 5-Azacytidin sollte eine eventuelle Beteiligung von DNA-Hypermethylierung an der verminderten Caspase-Expression geklärt werden. Der Einfluss einer Behandlung der Panc89-Zellen mit 1  $\mu$ M 5-Azacytidin (je 24h nach dem Aussäen und 1h vor Etoposidbehandlung) auf die Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 wurde mittels Western Blot Analyse untersucht. Die Abbildungen 4.14.A bis 4.14.D zeigen jeweils eine repräsentative Woche eines mehrwöchigen Versuchsdurchganges, von denen insgesamt fünf durchgeführt wurden. Die Detektion von HSP90 diente als Ladekontrolle. Durch die Behandlung der Panc89-Zellen mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin konnte das in den kokultivierten Zellen erniedrigte Expressionsniveau der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 wieder angehoben werden. In den MaC-Zellen konnte dieser Effekt nur teilweise beobachtet werden. Auf die Expression der Procaspasen in den monokultivierten Panc89-Zellen hatte die Behandlung mit 5-Azacytidin keinen Einfluss. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine DNA-Methylierung von Caspase-Genen selbst oder von Caspase-regulierenden Genen an der Herunterregulation der Procaspase-Expression in der Co-Kultur beteiligt ist.

##### Procaspase 8

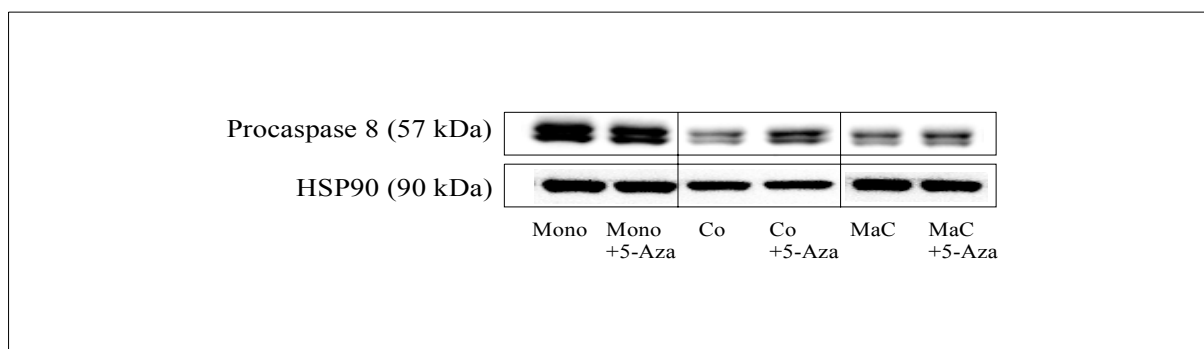


Abb. 4.14.A: Western Blot zur Detektion von Procaspase 8: Vergleich von unbehandelten und mit zweimal je 1  $\mu$ M DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin behandelten Panc89-Zellen Mono, Co und MaC, Beispiel aus der fünften Woche einer Co-Kultur

Die Expression der Procaspase 8 steigt in kokultivierten Panc89-Zellen nach Behandlung mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin an, in monokultivierten Zellen dagegen nicht.

### Procaspase 9

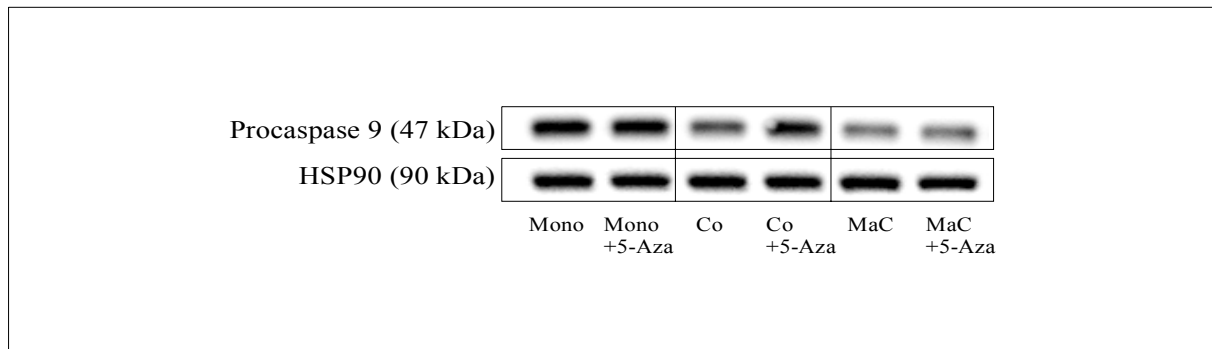


Abb. 4.14.B: *Western Blot zur Detektion von Procaspase 9: Vergleich von unbehandelten und mit zweimal je 1  $\mu$ M DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin behandelten Panc89-Zellen Mono, Co und MaC, Beispiel aus der vierten Woche einer Co-Kultur*

Die Expression der Procaspase 9 steigt in cokultivierten Panc89-Zellen nach Behandlung mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin an, in monokultivierten Zellen dagegen nicht.

### Procaspase 3

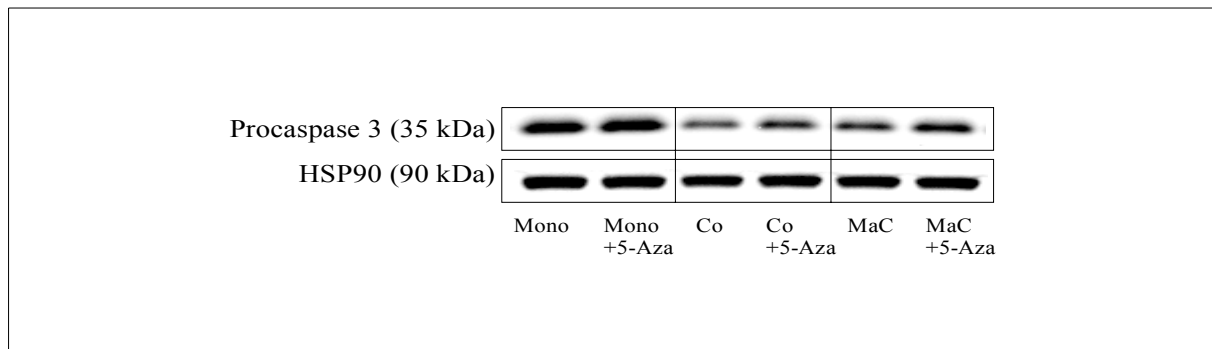


Abb. 4.14.C: *Western Blot zur Detektion von Procaspase 3: Vergleich von unbehandelten und mit zweimal je 1  $\mu$ M DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin behandelten Panc89-Zellen Mono, Co und MaC Beispiel aus der fünften Woche einer Co-Kultur*

Die Expression der Procaspase 3 steigt in cokultivierten Panc89-Zellen nach Behandlung mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin an, in monokultivierten Zellen dagegen nicht.

### Procaspase 7

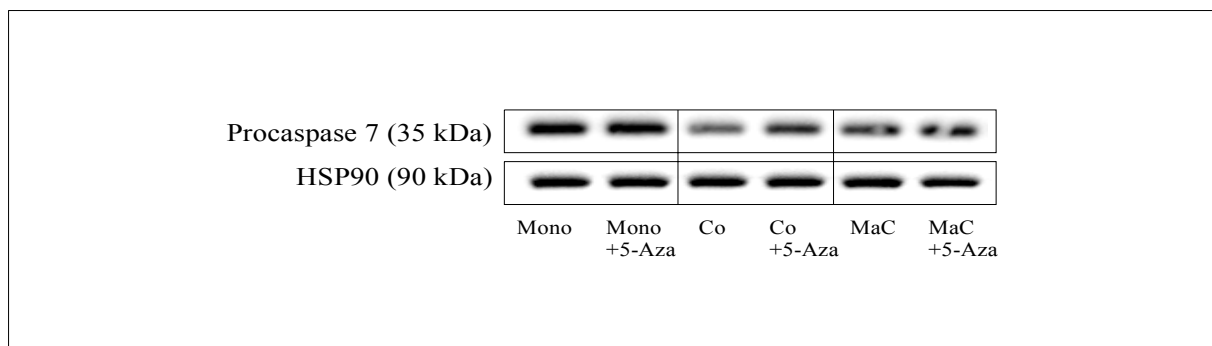


Abb. 4.14.D: *Western Blot zur Detektion von Procaspase 7: Vergleich von unbehandelten und mit zweimal je 1  $\mu$ M DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin behandelten Panc89-Zellen Mono, Co und MaC, Beispiel aus der vierten Woche einer Co-Kultur*

Die Expression der Procaspase 7 steigt in cokultivierten Panc89-Zellen nach Behandlung mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin an, in monokultivierten Zellen dagegen nicht.

---

#### **4.3.7. Apoptosemessung mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie nach Behandlung der Zellen mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin**

Der Einsatz des DNA-Methylierungsinhibitors 5-Azacytidin (1  $\mu$ M je 24h nach dem Aussäen und 1h vor Etoposidbehandlung) vermochte die erniedrigten Procaspase-Level in kokultivierten Panc89-Zellen zu steigern. Um zu überprüfen, ob 5-Azacytidin neben dieser Steigerung auch zu einer Sensitivierung gegenüber Zytostatika-induzierter Apoptose führt, wurde der Einfluss des DNA-Methylierungsinhibitors auf die Apoptoserate der Panc89-Zellen nach Etoposidbehandlung mittels einer Annexin V-FITC-/PI-Färbung mit anschließender Fluoreszenz-Durchflusszytometrie untersucht. Die Daten wurden mit Hilfe der Flomax Software ausgewertet.

Die Mittelwerte von sechs unabhängigen Versuchen für Panc89-Zellen Mono und Co sind in Abbildung 4.15. vergleichend dargestellt. Die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen sind zudem in Tab. 4.6. gesondert aufgeführt.

Die Apoptoserate nach Induktion mit Etoposid konnte durch die Vorbehandlung mit 5-Azacytidin in den kokultivierten Panc89-Zellen signifikant gesteigert werden, während bei den monokultivierten Panc89-Zellen kein sensitivierender Effekt von 5-Azacytidin gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose beobachtet werden konnte. Die MaC-Zellen wiesen nur eine geringfügige Sensitivierbarkeit durch die Behandlung mit 5-Azacytidin auf. Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden der Western Blot Analysen überein, in denen sich zeigte, dass die Behandlung mit 5-Azacytidin die erniedrigte Expression von Procaspasen in kokultivierten Panc89-Zellen anzuheben vermochte, während in monokultivierten Zellen dagegen kein und in MaC-Zellen nur ein sehr geringer Effekt zu sehen war.

Diese Durchflusszytometrie-Daten zeigen, dass infolge der Co-Kultur resistent gewordene Panc89-Zellen durch den Einsatz des DNA-Methylierungsinhibitors 5-Azacytidin für eine Zytostatikabehandlung mit Etoposid wieder sensitiviert werden können. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass nicht nur die Expression der Procaspasen, sondern damit auch das Chemoresistenzverhalten in kokultivierten Panc89-Zellen durch DNA-Methylierung von Caspase-Genen selbst oder von Caspase-regulierenden Genen beeinflusst wird.

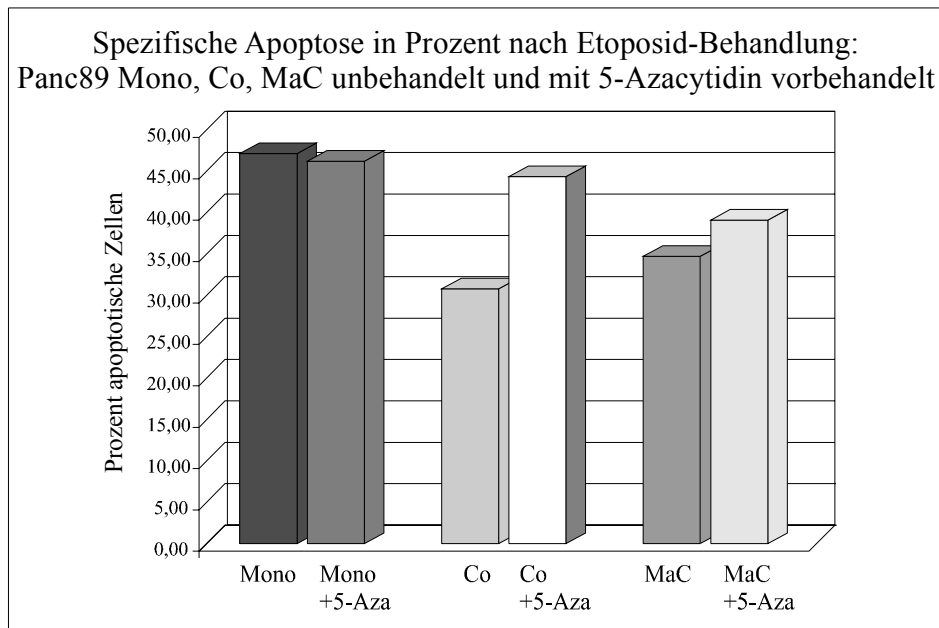


Abb. 4.15.: Spezifische Apoptose in Prozent nach Etoposidbehandlung: Mittelwerte aus sechs unabhängigen Versuchen aus verschiedenen Wochen der Co-Kultur-Durchgänge, Vergleich von Panc89-Zellen Mono, Co und MaC jeweils unbehandelt und mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin vorbehandelt (1 $\mu$ M je 24h nach dem Aussäen und 1h vor Etoposidbehandlung)

Die Behandlung mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin sensitiviert kokultivierte Panc89-Zellen gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose, monokultivierte Panc89-Zellen dagegen nicht.

Tab. 4.6.: Spezifische Apoptose in Prozent nach Etoposidbehandlung: Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Versuchen aus verschiedenen Wochen der Co-Kultur-Durchgänge, Vergleich von Panc89-Zellen Mono und Co jeweils unbehandelt und mit 5-Azacytidin vorbehandelt (je 1 $\mu$ M 24h nach dem Aussäen und 1h vor Etoposidbehandlung)

\* = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Panc89 Co-Zellen und dem Mittelwert der Panc89 Mono-Zellen ist statistisch signifikant mit  $p < 0,02$ .

+ = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der unbehandelten Panc89 Co-Zellen und dem Mittelwert der mit 5-Azacytidin vorbehandelten Panc89 Co-Zellen ist statistisch signifikant mit  $p < 0,02$ .

# = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der unbehandelten Panc89 MaC-Zellen und dem Mittelwert der mit 5-Azacytidin vorbehandelten Panc89 MaC-Zellen ist statistisch nicht signifikant.

	Mittelwert	Standard- abweichung
Mono	47,11	10,71
Mono+5-Azacytidin	46,16	4,87
Co	30,78 *	7,73
Co+5-Azacytidin	44,31 +	8,64
MaC	34,68	8,15
MaC+5-Azacytidin	39,08 #	4,22

#### 4.3.8. Aktivierung der MAP-Kinasen “*Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2*” (Erk1/Erk2)

Die Kinasen Erk1 und Erk2, auch p44- bzw. p42-MAP-Kinase genannt, sind Mitglieder der “*Mitogen Activated Protein Kinase*” (MAP-Kinase) Familie, die beide in derselben Proteinkinase-Kaskade wirken. Der Erk1/Erk2-Signalweg reguliert zumeist über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (z.B. AP-1) viele zellphysiologische Prozesse und hat dadurch Einfluss auf das zelluläre Überleben, die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung. Weiterhin ist bekannt, dass der Erk1/Erk2-MAP-Kinase-Signalweg die DNA-Hypermethylierung in Epithelzellen beeinflussen kann [Deng et al. 2003; Lu et al. 2005; Pruitt et al. 2005]. Um zu überprüfen, ob Erk1/Erk2 auch in dem Co-Kultursystem Einfluss auf das zelluläre Überleben ausübt oder an der vermuteten DNA-Hypermethylierung beteiligt ist, wurde die Expression der phosphorylierten MAP-Kinasen Erk1/Erk2 mittels Western Blot Analyse untersucht. In der Abbildung 4.16. sind verschiedene Wochen eines repräsentativen mehrwöchigen Versuchsdurchganges zu sehen. Es wurden insgesamt fünf mehrwöchige Versuchsdurchgänge durchgeführt. Die Detektion von HSP90 diente als Ladekontrolle.

In den cokultivierten Panc89-Zellen konnte ab der ersten Woche der Co-Kultur gegenüber den monokultivierten Panc89-Zellen vermehrt phosphoryliertes Erk1/Erk2 detektiert werden. Dahingegen war hinsichtlich der Erk1/Erk2-Phosphorylierung kein Unterschied zwischen Panc89 MaC-Zellen und Panc89 Mono-Zellen zu erkennen. Aus den Western Blot Analysen lässt sich schlussfolgern, dass die Co-Kultur mit murinen Pankreasfibroblasten in Panc89-Zellen eine erhöhte Expression von phosphoryliertem Erk1/Erk2 bewirkt, diese jedoch nicht über das Ende der Co-Kultur hinaus erhalten bleibt.

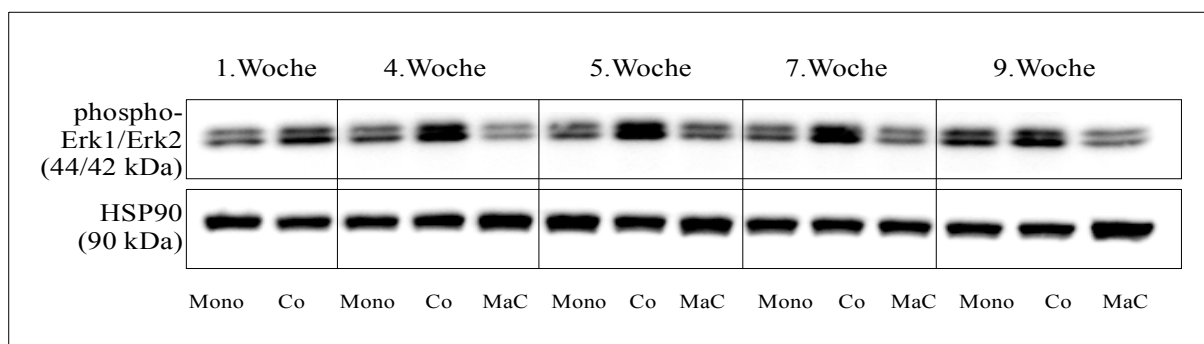


Abb. 4.16.: Western Blot zur Detektion von phosphorylierten MAP-Kinasen Erk1/Erk2: Vergleich von Panc89-Zellen Mono, Co und MaC

Die Menge an phosphoryliertem Erk1/Erk2 ist in cokultivierten Panc89-Zellen erhöht.

Durch den Einsatz des MAP-Kinase-Kinase-Inhibitors PD98059 (50 $\mu$ M 1h vor Etoposidbehandlung) kann die Menge an phosphoryliertem Erk1/Erk2 reduziert werden. Zur Kontrolle der Wirksamkeit des Inhibitors wurde ein Western Blot angefertigt, wodurch die Wirksamkeit des Inhibitors PD98059 in Mono- wie auch Co-Zellen gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 4.17). Auf die Untersuchung der Panc89 MaC-Zellen wurde verzichtet, da diese keine vermehrte Erk1/Erk2-Phosphorylierung zeigten (siehe Abbildung 4.16.).

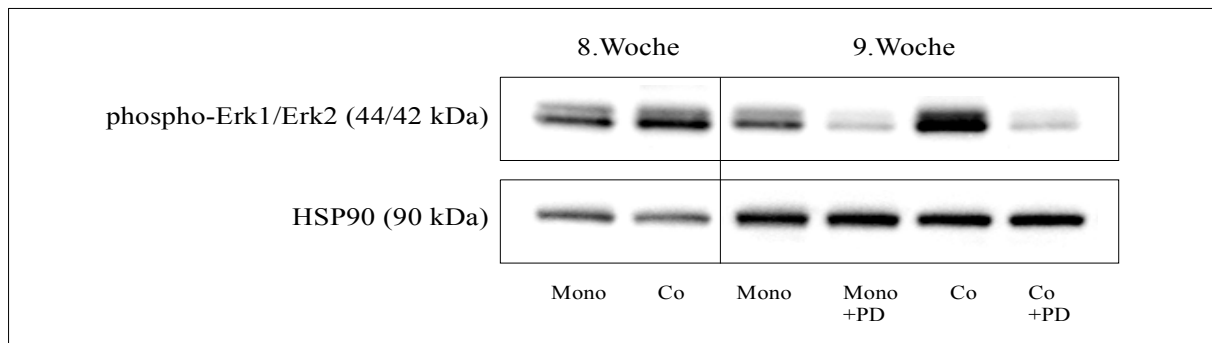


Abb. 4.17.: Western Blot zur Detektion von phosphorylierten MAP-Kinasen Erk1/Erk2: Vergleich von Panc89-Zellen Mono und Co vor und nach Behandlung mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 (50 $\mu$ M 1h vor Etoposidbehandlung)

Durch den Einsatz des MAP-Kinase-Kinase-Inhibitors PD98059 kann die Menge an phosphoryliertem Erk1/Erk2 reduziert werden.

#### 4.3.9. Apoptosemessung mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie nach Behandlung der Zellen mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059

Zur Klärung der Frage, ob die MAP-Kinasen Erk1/Erk2 Einfluss auf die Etoposid-induzierte Apoptoserate der kokultivierten Panc89-Zellen haben, wurden die Zellen mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 vorbehandelt (50 $\mu$ M 1h vor Etoposidbehandlung). Der Einfluss dieser Vorbehandlung wurde mittels einer Annexin V-FITC-/PI-Färbung in einem Fluoreszenz-Durchflusszytometer gemessen. Die Daten wurden mit Hilfe der Flomax Software ausgewertet.

Die Mittelwerte von sechs unabhängigen Versuchen für mono- und kokultivierte Panc89-Zellen sind in Abb. 4.18. vergleichend dargestellt. Die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen sind zudem in Tab. 4.7. gesondert aufgeführt. Auf die Untersuchung der Panc89 MaC-Zellen wurde verzichtet, da diese keine vermehrte Erk1/Erk2-Phosphorylierung zeigten. Die Behandlung der Panc89-Zellen mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 ließ die Apoptoserate nach Induktion mit Etoposid in den kokultivierten Zellen deutlich ansteigen,

während sie in den monokultivierten Zellen sogar leicht fiel. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigen, dass mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 die kokultivierten Panc89-Zellen für eine Zytostatikabehandlung mit Etoposid sensitiviert werden konnten, auch wenn mit dieser Behandlung die hohe Sensitivität gegenüber Zytostatika, die die monokultivierten Panc89-Zellen zeigten, nicht ganz erreicht werden konnte. Es ist daher zu vermuten, dass der Erk1/Erk2-MAP-Kinase-Signalweg eine Rolle bei der Ausprägung der Apoptoseresistenz in kokultivierten Panc89-Zellen spielt.

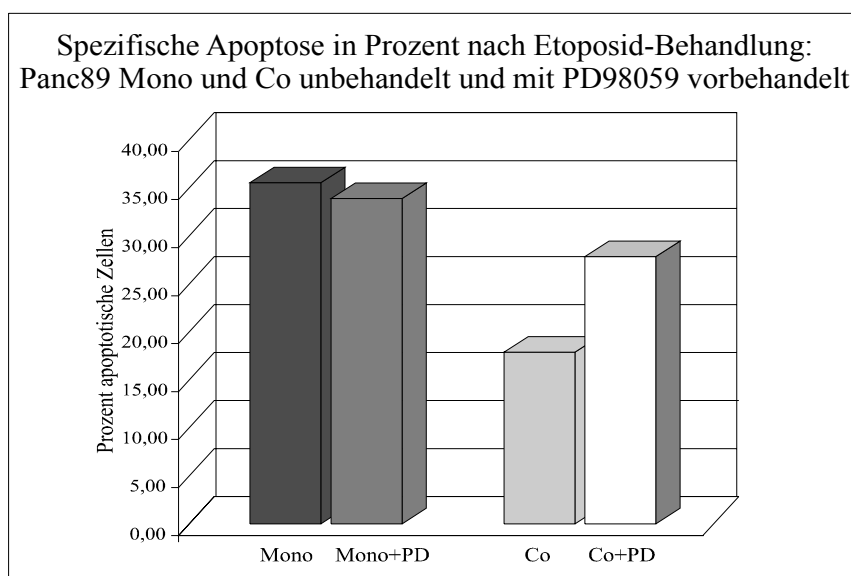


Abb. 4.18.: Spezifische Apoptose in Prozent nach Etoposidbehandlung: Mittelwerte aus sechs unabhängigen Versuchen aus verschiedenen Wochen der Co-Kultur-Durchgänge, Vergleich von Panc89-Zellen Mono und Co jeweils unbehandelt und mit PD98059 vorbehandelt (50 $\mu$ M 1h vor Etoposidbehandlung)

Die Behandlung mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 sensitiviert kokultivierte Panc89-Zellen gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose, monokultivierte Panc89-Zellen dagegen nicht.

Tab. 4.7.: Spezifische Apoptose in Prozent nach Etoposidbehandlung: Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Versuchen aus verschiedenen Wochen der Co-Kultur-Durchgänge, Vergleich von Panc89-Zellen Mono und Co jeweils unbehandelt und mit PD98059 vorbehandelt (50 $\mu$ M 1h vor Etoposidbehandlung)

\* = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Panc89 Co-Zellen und dem Mittelwert der Panc89 Mono-Zellen ist statistisch signifikant mit  $p < 0,02$ .

# = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der unbehandelten Panc89 Co-Zellen und dem Mittelwert der mit PD98059 vorbehandelten Panc89 Co-Zellen ist statistisch nicht signifikant.

	Mittelwert	Standard-abweichung
Mono	35,54	10,63
Mono+PD98059	33,89	10,44
Co	17,88 *	10,27
Co+PD98059	27,83 #	11,58

#### 4.3.10. Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 auf Proteinebene nach Behandlung der Zellen mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059

Nachdem gezeigt werden konnte, dass durch den Einsatz des MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 die kokultivierten Panc89-Zellen für eine Zytostatikabehandlung mit Etoposid sensitiviert werden konnten, wurde auch der Einfluss einer Vorbehandlung der Panc89-Zellen mit 50µM MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 auf die Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 untersucht. Dazu wurden Western Blots angefertigt, von denen in den Abbildungen 4.19.A bis 4.19.D jeweils eine repräsentative Woche eines Versuchsdurchganges dargestellt ist. Die Detektion von HSP90 diente als Ladekontrolle.

Die Behandlung mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 hatte in monokultivierten Panc89-Zellen keinen Effekt auf die Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7, wohingegen durch den Einsatz von PD98059 die verminderte Expression der Procaspase 8, 9, 3 und 7 in den kokultivierten Panc89-Zellen wieder erhöht werden konnte.

Es lässt sich daher schlussfolgern, dass der Erk1/Erk2-MAP-Kinase-Signalweg in die Herunterregulation der Procaspasen in diesem Co-Kultursystem involviert ist.

##### Procaspase 8

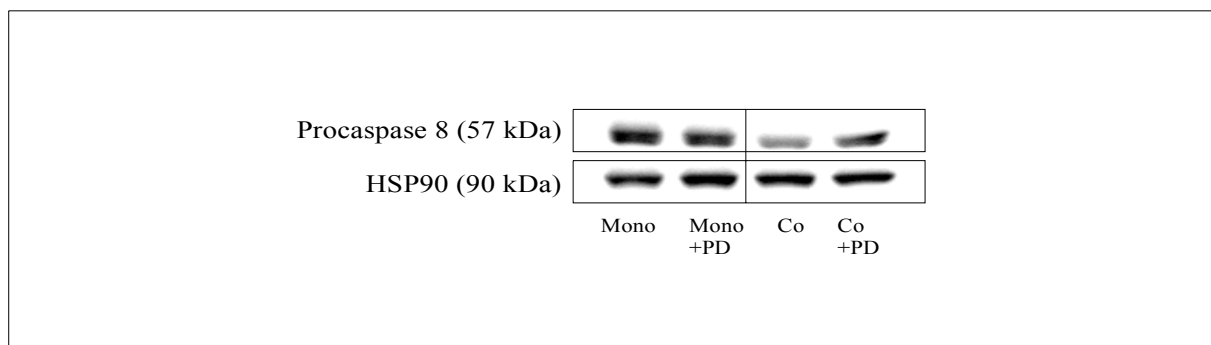


Abb. 4.19.A: Western Blot zur Detektion von Procaspase 8: Vergleich von unbehandelten und mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 behandelten Panc89-Zellen Mono und Co, (PD98059: 50µM 1h vor Etoposidbehandlung)

Die Expression der Procaspase 8 steigt in kokultivierten Panc89-Zellen nach Behandlung mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 an, in monokultivierten Zellen dagegen nicht.



### Procaspase 9

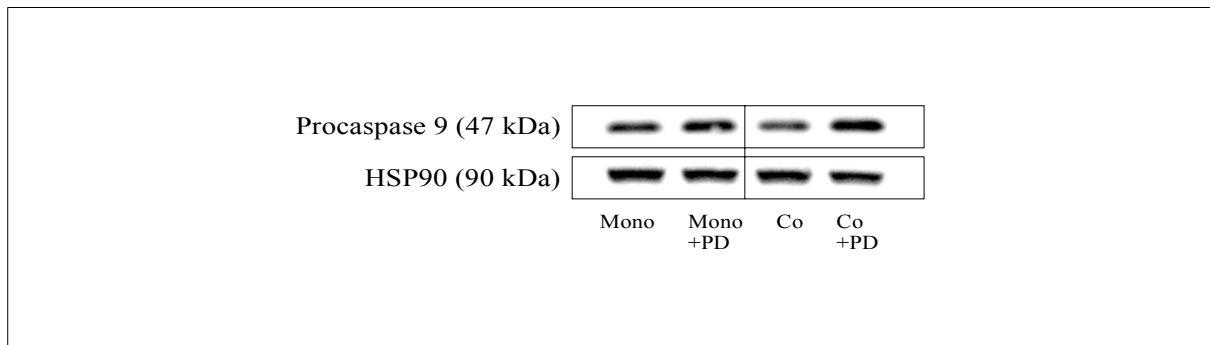


Abb. 4.19.B: *Western Blot zur Detektion von Procaspase 9: Vergleich von unbehandelten und mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 behandelten Panc89-Zellen Mono und Co, (PD98059: 50  $\mu$ M 1h vor Etoposidbehandlung)*

Die Expression der Procaspase 9 steigt in kokultivierten Panc89-Zellen nach Behandlung mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 an, in monokultivierten Zellen dagegen nicht.

### Procaspase 3

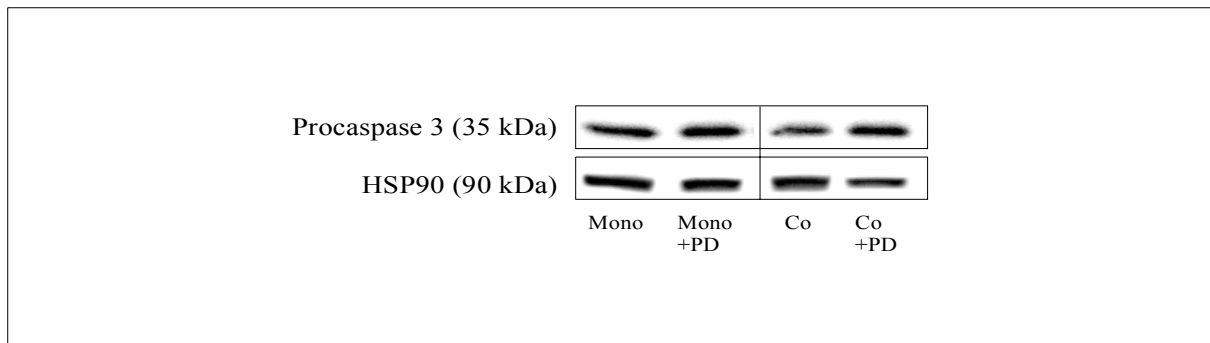


Abb. 4.19.C: *Western Blot zur Detektion von Procaspase 3: Vergleich von unbehandelten und mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 behandelten Panc89-Zellen Mono und Co, (PD98059: 50  $\mu$ M 1h vor Etoposidbehandlung)*

Die Expression der Procaspase 3 steigt in kokultivierten Panc89-Zellen nach Behandlung mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 an, in monokultivierten Zellen dagegen nicht.

### Procaspase 7

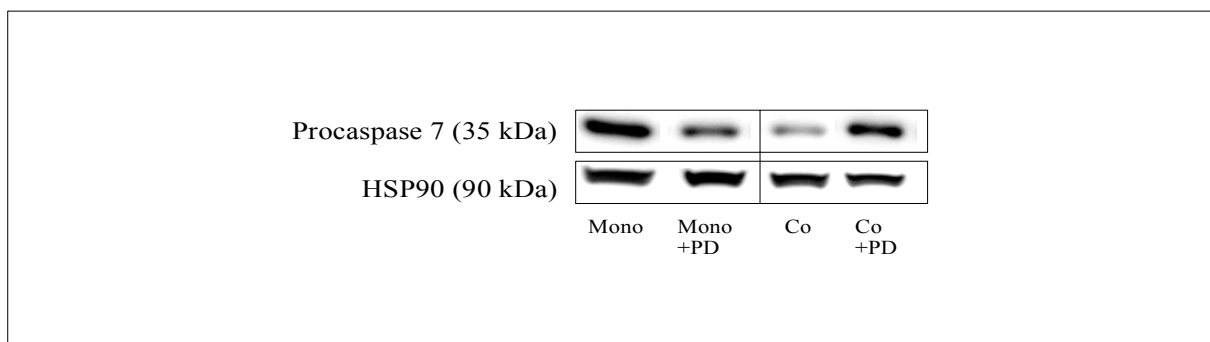


Abb. 4.19.D.: *Western Blot zur Detektion von Procaspase 7: Vergleich von unbehandelten und mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 behandelten Panc89-Zellen Mono und Co, (PD98059: 50  $\mu$ M 1h vor Etoposidbehandlung)*

Die Expression der Procaspase 7 steigt in kokultivierten Panc89-Zellen nach Behandlung mit dem MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 an, in monokultivierten Zellen dagegen nicht.

#### 4.3.11. Expression des Adhäsionsmoleküls L1CAM

Das Adhäsionsmolekül L1CAM (Synonym CD171) wurde in einer Reihe von Tumoren epithelialen Ursprungs nachgewiesen. Diese Expression wurde mit der Eigenschaft von L1CAM, Zellmigration zu induzieren und Apoptose zu inhibieren, in Verbindung gebracht. Bezüglich der Apoptoseinhibition sind besonders die Aktivierung des Erk1/Erk2-MAP-Kinase-Signalweges sowie die Aktivierung von PKB/Akt beschrieben, verbunden mit einer Inhibition der Caspase 9 Aktivierung [Loers et al. 2005]. Da in den kokultivierten Panc89-Zellen bereits eine erhöhte Aktivierung von Erk1/Erk2 (siehe Punkt 4.3.8) sowie eine verminderte Aktivierung besonders der Caspase 9 (siehe Punkt 4.3.4.2.) beobachtet werden konnte, sollte überprüft werden, ob auch L1CAM in den kokultivierten Zellen vermehrt exprimiert wird. Dazu wurde die Expression von L1CAM mittels Western Blot Analyse untersucht. Die Abbildung 4.20. zeigt verschiedene Wochen eines repräsentativen mehrwöchigen Versuchsdurchganges, von denen insgesamt fünf durchgeführt wurden. Die Detektion von HSP90 diente als Ladekontrolle.

Die Expression des Adhäsionsmoleküls L1CAM wurde in Panc89-Zellen durch die Co-Kultur mit murinen Pankreasfibroblasten stark gesteigert. Dieser Effekt konnte ab der zweiten Woche der Co-Kultur beobachtet werden und war ebenfalls in den MaC-Zellen zu sehen.

Die Western Blot Analysen zeigen, dass die Co-Kultivierung mit murinen Pankreasfibroblasten die Expression des Adhäsionsmoleküls L1CAM in Panc89-Zellen stark ansteigen lässt. Außerdem zeigt die erhöhte L1CAM-Expression in den MaC-Zellen, dass der L1CAM-exprimierende Phänotyp von den Panc89-Zellen auch über die Dauer der Co-Kultur hinaus gehalten wird.

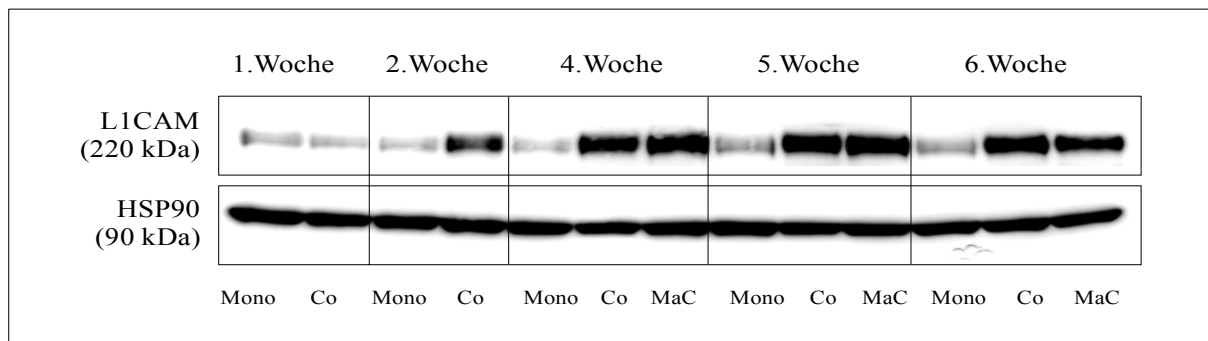


Abb. 4.20.: Western Blot zur Detektion von L1CAM: Vergleich von Panc89-Zellen Mono, Co und MaC

Die Co-Kultur mit murinen Pankreasfibroblasten erhöht die Expression des Adhäsionsmoleküls L1CAM in Panc89-Zellen.

---

#### **4.4. Versuche in vivo: Vergleich von Panc89 Mono- und Co-Tumoren**

Der Einfluss von Tumor-Stroma-Interaktionen auf die Ausbildung von Chemoresistenz sollte auch in vivo in einem SCID-Maus-Modell untersucht werden. Den Tieren wurden subkutan entweder nur Panc89-Zellen (Mono-Tumore) oder entsprechend dem Verhältnis der in vitro Versuche ein Gemisch aus Panc89-Zellen und murinen Fibroblasten (Co-Tumore) injiziert.

Die Tiere blieben zunächst unbehandelt und erhielten dann nach Erreichen einer durchschnittlichen Tumorgroße von 20mm<sup>2</sup> entweder eine mehrtägige Behandlung mit Etoposid oder als Kontrolle Injektionen mit 0,9%iger Natriumchloridlösung.

##### **4.4.1. Tumorwachstum**

###### **4.4.1.1. Tumolvolumen**

Zur Kontrolle des Tumorwachstums wurden die Tumore entweder dreizehn Tage nach Inokulation (= erster Entnahmezeitpunkt), zwanzig Tage nach Inokulation (= zweiter Entnahmezeitpunkt) oder fünf Tage nach Ende der Behandlung (~34.Tag nach Inokulation = dritter und letzter Entnahmezeitpunkt) entnommen und vermessen. Die ersten beiden Zeitpunkte lagen dabei vor dem Beginn der Behandlung der Tiere.

Abbildung 4.21. zeigt für die Entnahmezeitpunkte 1 und 2 die Mittelwerte der Volumina von Tumoren der unbehandelten Tiere aus zwei unabhängigen Versuchen sowie für den Entnahmezeitpunkt 3 die Mittelwerte der Volumina von Tumoren der mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Tiere aus drei unabhängigen Versuchen. In der Tabelle 4.8. sind die Mittelwerte und Standardabweichungen noch einmal gesondert aufgeführt. Die minimale Tierzahl zu einem Zeitpunkt, die zur Ermittlung der Mittelwerte und Standardabweichungen herangezogen wurde, lag bei 5 Tieren.

Das Wachstum sowohl der Mono- als auch der Co-Tumore verlief exponentiell. Die Wachstumskurve der Co-Tumore stieg weniger stark an als die der Mono-Tumore, die Unterschiede waren jedoch zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant.

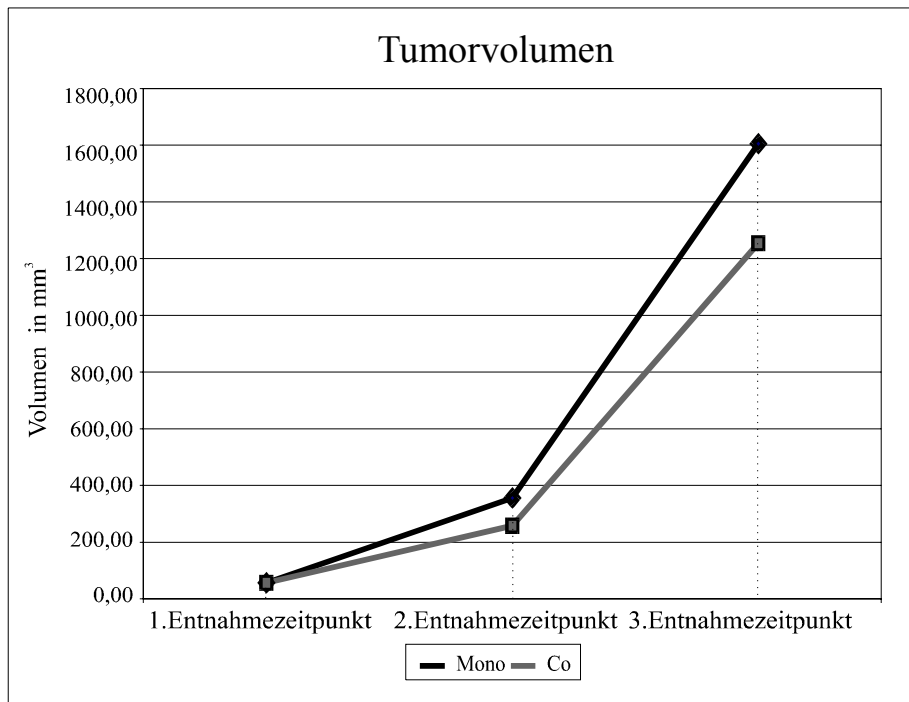


Abb. 4.21.: Verlauf der Tumolvolumina in mm<sup>3</sup>: Mittelwerte aus zwei (Zeitpunkte 1 und 2) bzw. drei (Zeitpunkt 3) unabhängigen Versuchen, Vergleich von Panc89 Mono- und Co-Tumoren

Sowohl Mono- als auch Co-Tumore wachsen exponentiell. Co-Tumore wachsen etwas langsamer als Mono-Tumore.

Tab. 4.8.: Tumolvolumen in mm<sup>3</sup>: Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei (Zeitpunkte 1 und 2) bzw. drei (Zeitpunkt 3) unabhängigen Versuchen, Vergleich von Panc89-Mono- und Co-Tumoren

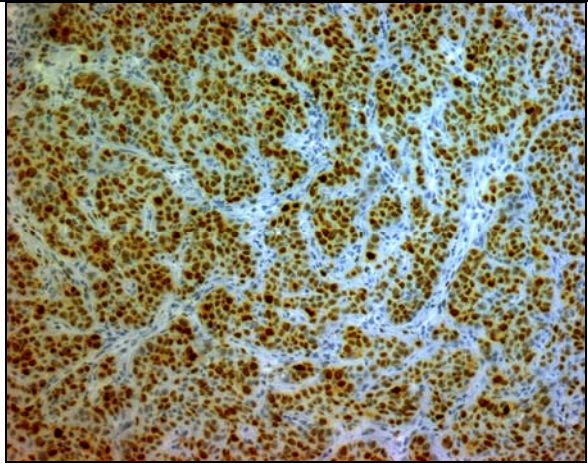
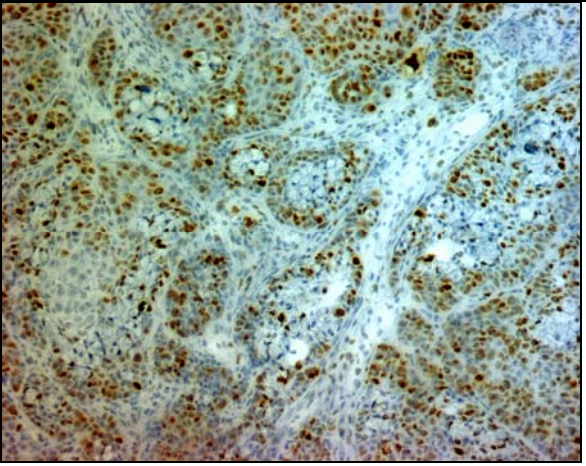
# = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Panc89 Mono-Tumore und dem Mittelwert der Panc89 Co-Tumore ist statistisch nicht signifikant.

Zeitpunkt		Mittelwert	Standard-abweichung	Anzahl
1 #	Mono	57	35	6
	Co	57	29	6
2 #	Mono	356	256	5
	Co	258	112	6
3 #	Mono	1605	673	12
	Co	1254	545	13

#### 4.4.1.2. Proliferation (Immunhistologische Färbung Ki67)

Von den Tumoren wurden Schnitte gefertigt, die auf den Proliferationsmarker Ki67 gefärbt wurden. Mit dem Marker werden alle Zellen, die sich nicht in der G0-Zellzyklusphase befinden, gefärbt. Zu allen drei Zeitpunkten waren in den Co-Tumoren etwas weniger Ki67-positive Zellen zu beobachten als in den Mono-Tumoren (statistische Auswertung zum Zeitpunkt 3 siehe Punkt 4.4.5.). Diese Beobachtung korreliert mit den etwas geringeren

Tumorzellvolumina der Co-Tumore (siehe Punkt 4.4.1.1.). Als Beispiel für diese Färbung sind jeweils ein Mono- und ein Co-Tumor in Abbildung 4.22. in Übersicht (100fache Vergrößerung) gezeigt.

	
Abb. 4.22.A: <i>Ki67-Färbung</i> <i>Mono-Tumor, 100fache Vergrößerung</i>	Abb. 4.22.B: <i>Ki67-Färbung</i> <i>Co-Tumor, 100fache Vergrößerung</i>
In Mono-Tumoren (Bild links) sind ca. 80% der epithelialen Zellen braun gefärbt und somit positiv für den Proliferationsmarker Ki67. In Co-Tumoren (Bild rechts) sind ca. 60-70% der epithelialen Zellen positiv. In Co-Tumoren proliferieren geringfügig weniger Tumorzellen als in Mono-Tumoren.	

#### 4.4.2. Epithelialer und stromaler Anteil der Tumore

Um zu überprüfen, ob sich die Mono- und Co-Tumore hinsichtlich ihrer Zusammensetzung aus Tumor- und Stromakompartiment unterscheiden, wurde der epitheliale und stromale Anteil der Tumore jeweils mittels immunhistologischer Färbungen auf Pan-Cytokeratin und “ *$\alpha$ -Smooth Muscle Actin*“ ( $\alpha$ -SMA) ermittelt. Die Auswertung erfolgte wie unter Punkt 3.10.3.1. beschrieben.

##### 4.4.2.1. Cytokeratin

Die immunhistologische Färbung auf den Epithel-Marker Cytokeratin ermöglichte eine Bestimmung der epithelialen Anteile der Tumore. Dargestellt ist in Abbildung 4.23. die Auswertung für den Mittelwert aus zwei (Zeitpunkte 1 und 2) bzw. drei Versuchen (Zeitpunkt 3). Die Tabelle 4.9. zeigt eine Übersicht über die Mittelwerte und Standardabweichungen. Die minimale Tierzahl zu einem Zeitpunkt, die zur Ermittlung der Mittelwerte und Standardabweichungen herangezogen wurde, lag bei fünf Tieren.

Der epitheliale Anteil lag in Co-Tumoren sowohl dreizehn als auch zwanzig Tage nach Inokulation (= erster und zweiter Entnahmezeitpunkt) geringfügig unter dem epithelialen

Anteil in Mono-Tumoren. Der Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant. Zum Ende des Versuches war der Anteil der Karzinomzellen bei Co-Tumoren im gleichen Maße ausgeprägt wie bei Mono-Tumoren. Insgesamt nahm in allen Tumoren der epitheliale Anteil im Verhältnis zum stromalen Anteil im Laufe der Zeit leicht zu. Die Zunahme war jedoch statistisch nicht signifikant.

Festzuhalten ist, dass der epitheliale Anteil in Co-Tumoren bis zum 20.Tag nach Inokulation leicht unter dem in Mono-Tumoren lag, sich das Verhältnis aber bis zum Ende der Versuche anglich.

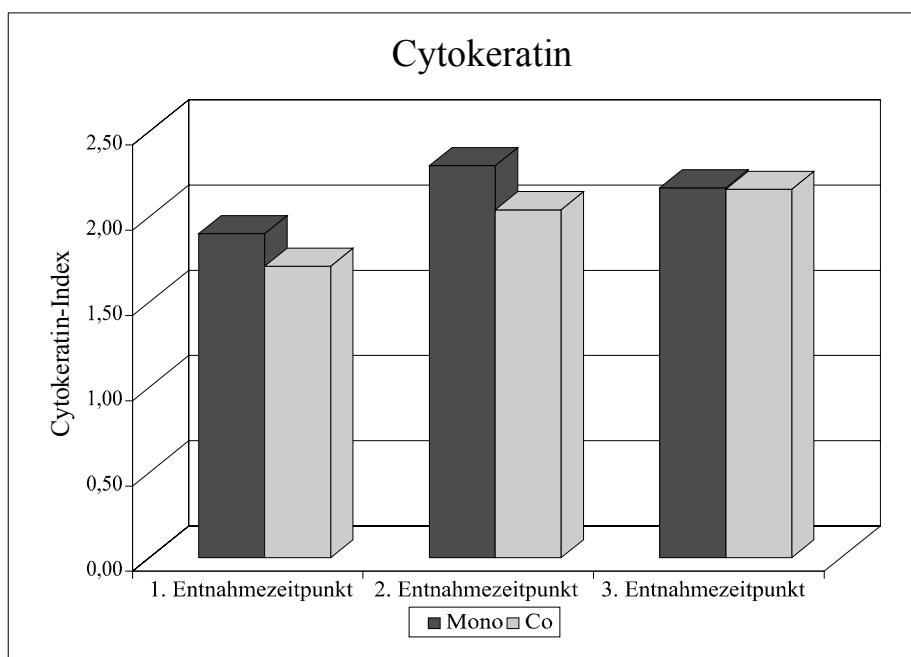


Abb. 4.23.: Epithelialer Anteil in Mono- und Co-Tumoren zu drei verschiedenen Zeitpunkten, Mittelwert aus zwei (Zeitpunkte 1 und 2) bzw. drei Versuchen (Zeitpunkt 3)

Der epitheliale Anteil liegt in Co-Tumoren zu Beginn leicht unter dem in Mono-Tumoren, das Verhältnis gleicht sich aber bis zum Ende des Versuches an.


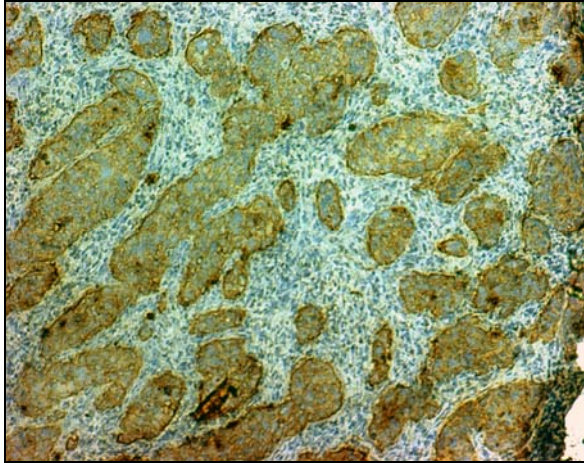
Tab. 4.9.: Epithelialer Anteil in Mono- und Co-Tumoren zu drei verschiedenen Zeitpunkten, Mittelwert aus zwei (Zeitpunkte 1 und 2) bzw. drei Versuchen (Zeitpunkt 3)

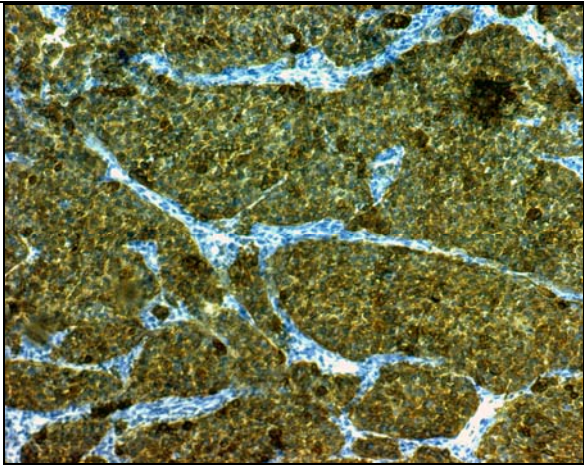
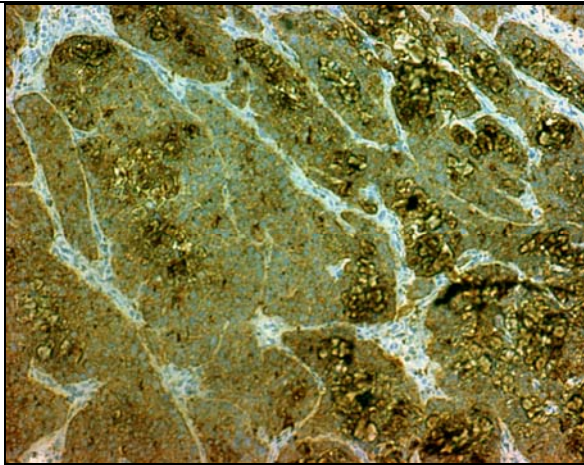
# = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Panc89 Mono-Tumore und dem Mittelwert der Panc89 Co-Tumore ist statistisch nicht signifikant.

Zeitpunkt		Mittelwert	Standard-abweichung	Anzahl
1 #	Mono	1,90	0,45	6
	Co	1,71	0,40	6
2 #	Mono	2,30	0,21	5
	Co	2,04	0,19	6
3 #	Mono	2,17	0,43	9
	Co	2,16	0,52	11



Als Beispiel sind in Abbildung 4.24. jeweils ein Mono- und ein Co-Tumor zum ersten und zum dritten Entnahmezeitpunkt gezeigt.

1. Entnahmezeitpunkt	
	
Abb. 4.24.A: <i>Cytokeratin-Färbung Mono-Tumor, 100fache Vergrößerung</i>	Abb. 4.24.B: <i>Cytokeratin-Färbung Co-Tumor, 100fache Vergrößerung</i>
<p>Braun gefärbte, Cytokeratin-positive = epitheliale Bereiche haben zu Beginn des Tumorstadiums in Co-Tumoren (Bild rechts) einen geringeren Anteil am Gesamtumor als in Mono-Tumoren (Bild links).</p> <p>Nicht gefärbte, Cytokeratin-negative Stromazellen stellen dagegen in Co-Tumoren (Bild rechts) im Vergleich zu Mono-Tumoren (Bild links) den größeren Anteil dar.</p>	

3. Entnahmezeitpunkt	
	
Abb. 4.24.C: <i>Cytokeratin-Färbung Mono-Tumor, 100fache Vergrößerung</i>	Abb. 4.24.D: <i>Cytokeratin-Färbung Co-Tumor, 100fache Vergrößerung</i>
<p>Braun gefärbte, Cytokeratin-positive = epitheliale Bereiche machen bei Versuchsende sowohl in Mono-Tumoren (Bild links) als auch in Co-Tumoren (Bild rechts) einen Großteil des Gesamtumors aus, während nicht gefärbte, negative Stromazellen sowohl bei Mono- als auch bei Co-Tumoren nur einen geringen Anteil am Gesamtumor darstellen.</p> <p>Ein Unterschied zwischen Mono- und Co-Tumoren ist nicht mehr zu erkennen.</p>	

---

#### 4.4.2.2. $\alpha$ -SMA

Das duktale Pankreasadenokarzinom ist gekennzeichnet durch Bildung eines massiven Stromas, dessen Hauptkomponenten neben Immunzellen und Endothelzellen vor allem Fibroblasten sind. Daher wurden in dem verwendeten SCID-Maus-Modell -wie auch in den in vitro Experimenten- Pankreasfibroblasten coinokuliert und als Stromakomponente analysiert. Die stromalen Anteile des Gesamttumors wurden durch eine immunhistologische Färbung auf  $\alpha$ -SMA, einem Marker für Myofibroblasten, bestimmt.

In Abbildung 4.25. wird die Auswertung für den Mittelwert aus zwei (Zeitpunkte 1 und 2) bzw. drei Versuchen (Zeitpunkt 3) gezeigt. In der Tabelle 4.10. sind die Mittelwerte und Standardabweichungen gesondert aufgeführt. Die minimale Tierzahl zu einem Zeitpunkt, die zur Ermittlung der Mittelwerte und Standardabweichungen herangezogen wurde, lag bei fünf Tieren.

Der Anteil des Stromas lag in Co-Tumoren dreizehn Tage nach Inokulation (= erster Entnahmezeitpunkt) signifikant höher als in Mono-Tumoren. Auch zwanzig Tage nach Inokulation (= zweiter Entnahmezeitpunkt) wiesen die Co-Tumore einen höheren Stroma-Anteil auf als die Mono-Tumore, ehe sich das Verhältnis bis zum Ende des Versuches (= dritter Entnahmezeitpunkt) angleich. Insgesamt nahm der stromale Anteil der Tumore im Verhältnis zum epithelialen Anteil im Laufe der Zeit leicht ab.



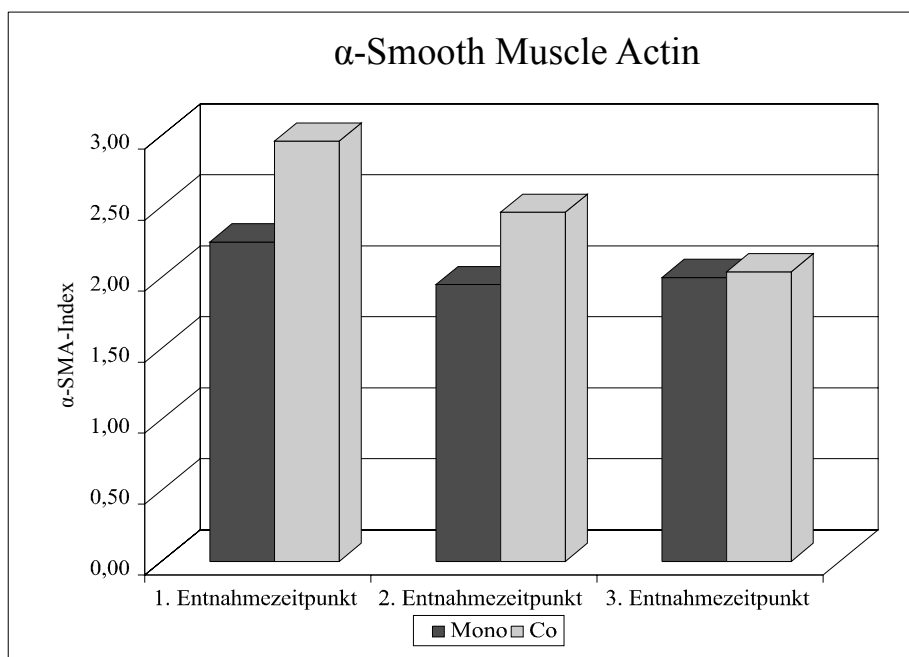


Abb. 4.25.: Stroma-Anteil in Mono- und Co-Tumoren zu drei verschiedenen Zeitpunkten, Mittelwert aus zwei (Zeitpunkte 1 und 2) bzw. drei Versuchen (Zeitpunkt 3)

Der stromale Anteil liegt in Co-Tumoren zu Beginn über dem in Mono-Tumoren, das Verhältnis gleicht sich aber bis zum Ende der Versuche an.

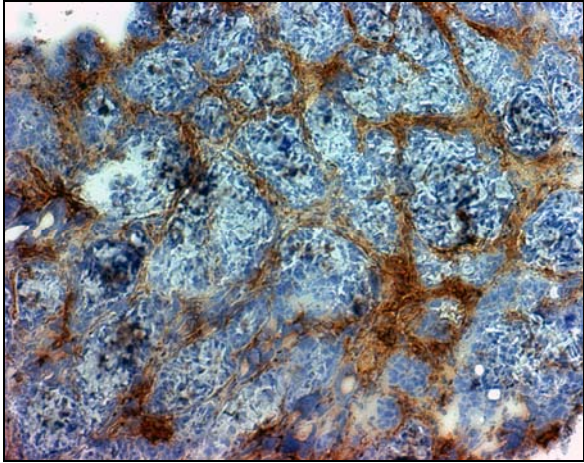
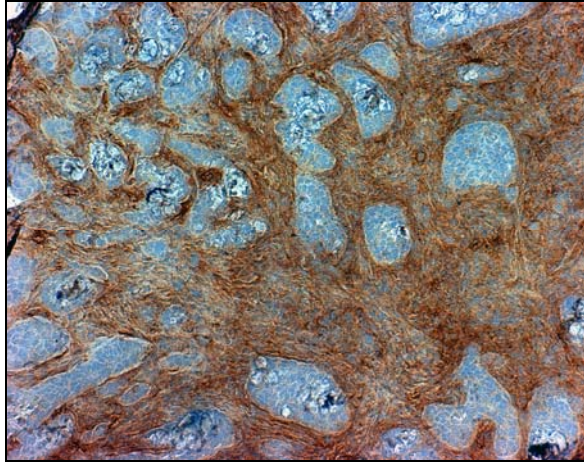
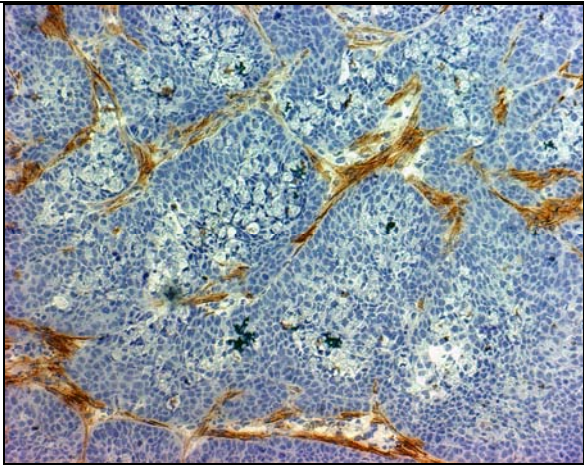
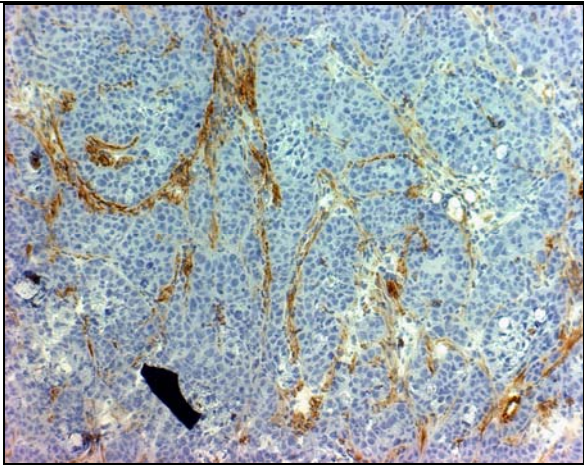
Tab. 4.10.: Stroma-Anteil in Mono- und Co-Tumoren zu drei verschiedenen Zeitpunkten, Mittelwert aus zwei (Zeitpunkte 1 und 2) bzw. drei Versuchen (Zeitpunkt 3)

\* = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Panc89 Mono-Tumore und dem Mittelwert der Panc89 Co-Tumore ist statistisch signifikant mit  $p < 0,05$ .

# = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Panc89 Mono-Tumore und dem Mittelwert der Panc89 Co-Tumore ist statistisch nicht signifikant.

Zeitpunkt		Mittelwert	Standard-abweichung	Anzahl
1 *	Mono	2,25	0,35	6
	Co	2,96	0,64	6
2 #	Mono	1,95	0,37	5
	Co	2,46	0,43	6
3 #	Mono	2,00	0,55	11
	Co	2,04	0,55	13

Als Beispiel sind in Abbildung 4.26. jeweils ein Mono- und ein Co-Tumor zum ersten und zum dritten Entnahmezeitpunkt gezeigt.

1. Entnahmezeitpunkt	
	
Abb. 4.26.A: $\alpha$ -SMA-Färbung Mono-Tumor, 100fache Vergrößerung	Abb. 4.26.B: $\alpha$ -SMA-Färbung Co-Tumor, 100fache Vergrößerung
<p>Braun gefärbte, <math>\alpha</math>-SMA-positive = stromale Bereiche haben zu Beginn des Tumorwachstums in Co-Tumoren (Bild rechts) einen größeren Anteil am Gesamttumor als in Mono-Tumoren (Bild links).</p> <p>Nicht gefärbte, <math>\alpha</math>-SMA-negative Epithelzellen sind dagegen in Co-Tumoren (Bild rechts) weniger zahlreich vertreten als in Mono-Tumoren (Bild links).</p>	
3. Entnahmezeitpunkt	
	
Abb. 4.26.C: $\alpha$ -SMA-Färbung Mono-Tumor, 100fache Vergrößerung	Abb. 4.26.D: $\alpha$ -SMA-Färbung Co-Tumor, 100fache Vergrößerung
<p>Braun gefärbte, <math>\alpha</math>-SMA-positive = stromale Bereiche machen bei Versuchsende sowohl in Mono-Tumoren (Bild links) als auch in Co-Tumoren (Bild rechts) nur einen kleinen Teil des Gesamttumors aus, während nicht gefärbte, <math>\alpha</math>-SMA-negative Epithelzellen sowohl bei Mono- als auch bei Co-Tumoren den Großteil des Gesamttumors bilden.</p> <p>Ein Unterschied zwischen Mono- und Co-Tumoren ist nicht mehr zu erkennen.</p>	

#### 4.4.3. Tumorstadium nach Behandlung der Tiere mit Etoposid bzw. 0,9%iger Natriumchloridlösung

Die Tiere wurden zwei je viertägigen Behandlungszyklen mit Etoposid bzw. 0,9%iger Natriumchloridlösung unterzogen. Fünf Tage nach Therapieende wurden die Primärtumore entnommen, vermessen und für immunhistologische Analysen schockgefroren. In der Abbildung 4.27. sind die Mittelwerte der gemessenen Tumorstadien von zwei unabhängigen Versuchen dargestellt. In der Tabelle 4.11. sind die Mittelwerte und Standardabweichungen abzulesen. Die Tierzahl, die zur Ermittlung der Mittelwerte und Standardabweichungen herangezogen wurde, betrug je nach Gruppe zwischen 8 und 17 Tieren.

Nach zwei viertägigen Behandlungszyklen mit Etoposid zeigten die Mono-Tumore eine signifikante Reduktion des mittleren Tumorstadiums um 46,1% von 1548 mm<sup>3</sup> auf 834 mm<sup>3</sup>, während die Etoposidtherapie bei den Co-Tumoren nur eine geringe Abnahme des mittleren Tumorstadiums um 13,9% von 1487 mm<sup>3</sup> auf 1281 mm<sup>3</sup> bewirken konnte.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Co-Tumore deutlich weniger auf eine Therapie mit dem Zytostatikum Etoposid ansprechen als die Mono-Tumore.

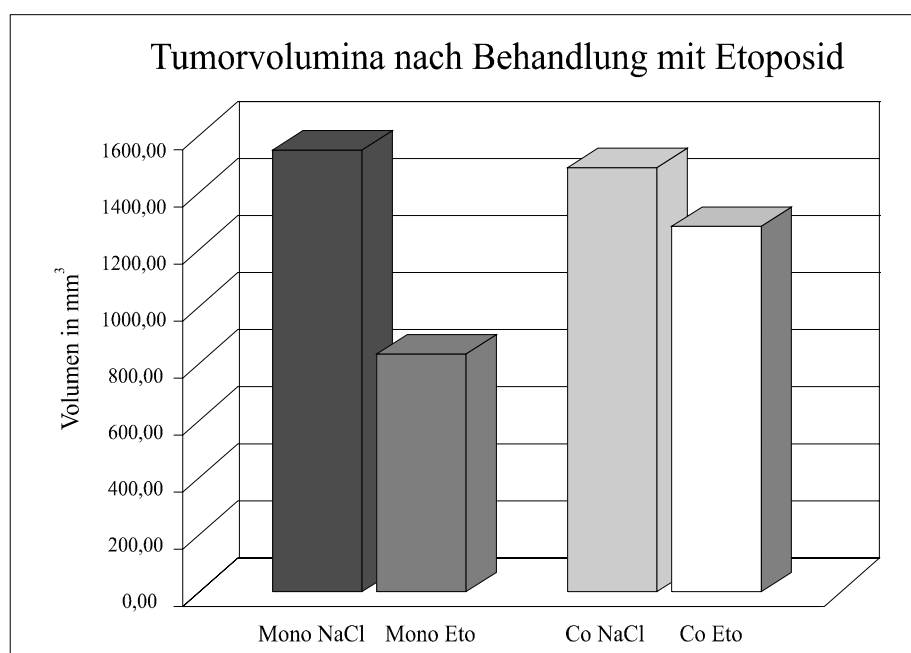


Abb. 4.27: Vergleich der Tumorstadien von Mono- und Co-Tumoren nach Behandlung mit Etoposid bzw. 0,9%iger Natriumchloridlösung

Bei Tieren mit Co-Tumoren wird das Tumorstadium durch eine Therapie mit Etoposid deutlich weniger reduziert als bei Tieren mit Mono-Tumoren.

Tab. 4.11.: *Tumorzusammenfassung: Mittelwerte und Standardabweichungen von Mono- und Co-Tumoren nach Behandlung mit Etoposid bzw. 0,9%iger Natriumchloridlösung*

\* = Panc89 Mono-Tumore: Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Tumore aus den mit 0,9%iger Natriumchloridlösung behandelten Tieren gegenüber dem Mittelwert der Tumore aus den mit Etoposid behandelten Tieren ist statistisch signifikant mit  $p < 0,04$ .

# = Panc89 Co-Tumore: Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Tumore aus den mit 0,9%iger Natriumchloridlösung behandelten Tieren gegenüber dem Mittelwert der Tumore aus den mit Etoposid behandelten Tieren ist statistisch nicht signifikant.

	Mittelwert	Standard- abweichung	Anzahl
Mono NaCl	1548	724	8
Mono Eto *	834	289	13
Co NaCl	1487	468	9
Co Eto #	1281	510	17

#### **4.4.4. Anzahl apoptotischer Zellen nach Behandlung der Tiere mit Etoposid bzw. 0,9%iger Natriumchloridlösung (Immunhistologische Färbung TUNEL)**

Um zu überprüfen, ob das unterschiedliche Ansprechen der Mono- bzw. Co-Tumore auf die Etoposidtherapie seine Ursache in einer differierenden Apoptoserate hat, wurden die Tumore mittels einer TUNEL-Färbung untersucht. Die Auswertung erfolgte wie unter Punkt 3.10.3.2. beschrieben.

In der Abbildung 4.28. sind die Mittelwerte der ermittelten apoptotischen Zellen pro HPF von zwei unabhängigen Versuchen zu sehen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in der Tabelle 4.12. gesondert dargestellt. Die Tierzahl, die zur Ermittlung der Mittelwerte und Standardabweichungen herangezogen wurde, betrug zwischen 7 und 17 Tieren.

Nach einer Behandlung der Tiere mit dem Zytostatikum Etoposid stieg die Rate der apoptotischen Zellen in Mono-Tumoren von 2,78 apoptotische Zellen/HPF auf 4,81 apoptotische Zellen/HPF an, in Co-Tumoren war dagegen kein Anstieg zu verzeichnen. Die Zunahme in Mono-Tumoren wies dabei eine hohe Standardabweichung auf und war statistisch nicht signifikant.

Die Behandlung mit Etoposid scheint in den Mono-Tumoren zu einer erhöhten Apoptoserate zu führen, in den Co-Tumoren jedoch nicht.

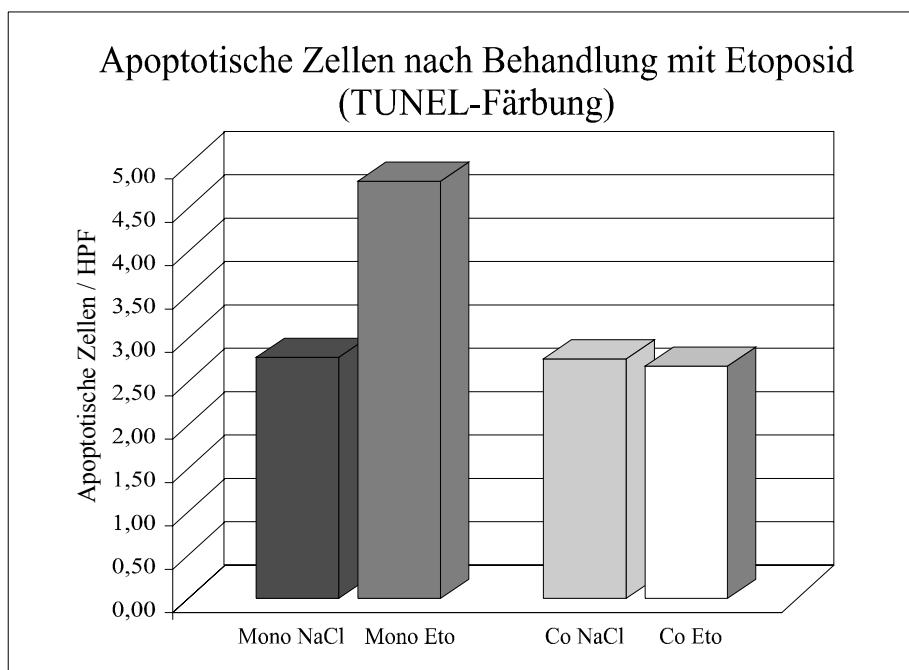


Abb. 4.28.: Apoptotische Zellen pro HPF (400fache Vergrößerung): Vergleich von Mono- und Co-Tumoren nach Behandlung mit Etoposid bzw. 0,9%iger Natriumchloridlösung  
Die Zahl der apoptotischen Zellen nach Etoposidbehandlung steigt im Mittel in Mono-Tumoren an, in Co-Tumoren dagegen nicht.

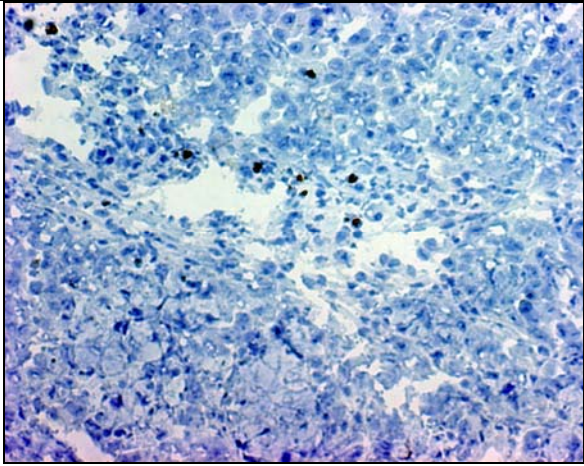
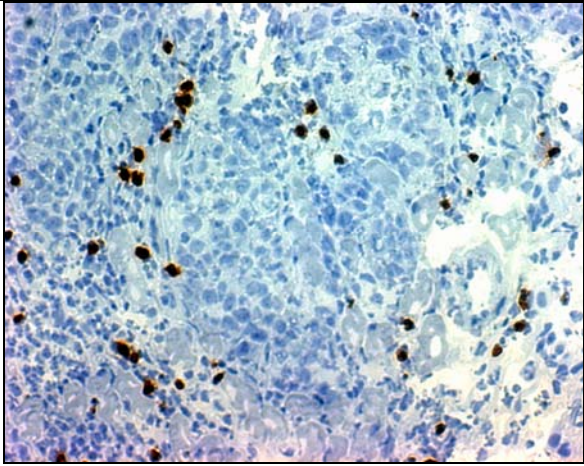
Tab. 4.12.: Apoptotische Zellen pro HPF (400fache Vergrößerung): Mittelwerte und Standardabweichungen von Mono- und Co-Tumoren nach Behandlung mit Etoposid bzw. 0,9%iger Natriumchloridlösung

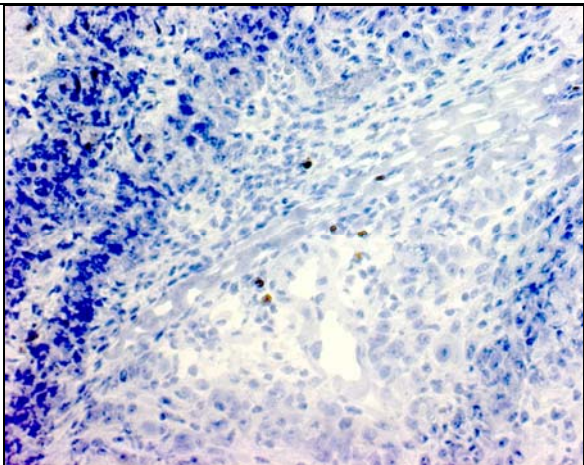
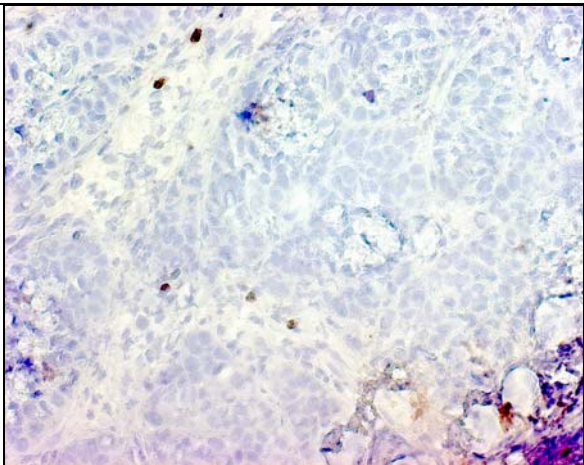
# = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Tumore aus den mit 0,9%iger Natriumchloridlösung behandelten Tieren gegenüber dem Mittelwert der Tumore aus den mit Etoposid behandelten Tieren ist statistisch nicht signifikant.

	Mittelwert	Standard- abweichung	Anzahl
Mono NaCl	2,78	1,04	7
Mono Eto #	4,81	3,61	13
Co NaCl	2,76	1,62	8
Co Eto #	2,68	1,93	17



In Abbildung 4.29. sind beispielhaft je ein Mono-Tumor und ein Co-Tumor aus Mäusen gezeigt, die entweder mit einer 0,9%iger Natriumchloridlösung oder mit Etoposid behandelt wurden.

Mono-Tumor	
	
Abb. 4.29.A: TUNEL-Färbung Mono-Tumor, 250fache Vergrößerung	Abb. 4.29.B: TUNEL-Färbung Mono-Tumor nach Etoposidbehandlung, 250fache Vergrößerung
In Mono-Tumoren sind nach der Behandlung mit Natriumchloridlösung (Bild links) nur wenige Zellen braun gefärbt = apoptotisch. Nach der Behandlung mit Etoposid (Bild rechts) steigt die Anzahl der apoptotischen Zellen in der Mehrzahl der Mono-Tumore stark an.	

Co-Tumor	
	
Abb. 4.29.C: TUNEL-Färbung Co-Tumor, 250fache Vergrößerung	Abb. 4.29.D: TUNEL-Färbung Co-Tumor nach Etoposidbehandlung, 250fache Vergrößerung
In Co-Tumoren sind nach der Behandlung mit Natriumchloridlösung (Bild links) nur wenige Zellen braun gefärbt = apoptotisch. Nach der Behandlung mit Etoposid steigt die Anzahl der apoptotischen Zellen in Co-Tumoren kaum an. Co-Tumore weisen nach Etoposidbehandlung weniger apoptotische Zellen auf als die Mehrzahl der Mono-Tumore nach Etoposidbehandlung.	

#### 4.4.5. Proliferation der Tumore nach Behandlung der Tiere mit Etoposid bzw. 0,9%iger Natriumchloridlösung (Immunhistologische Färbung Ki67)

Die Behandlung der Mäuse mit Etoposid erhöht die Apoptoserate in Mono-Tumoren stärker als in Co-Tumoren. Ob die Zytostatikatherapie auch Einfluss auf die Proliferation von Mono- und Co-Tumoren nimmt, wurde durch immunhistologische Färbungen auf den Proliferationsmarker Ki67 in den Tumoren des letzten Entnahmezeitpunktes (fünf Tage nach Ende der Behandlung) überprüft. Die Auswertung erfolgte wie unter Punkt 3.10.3.3. beschrieben.

In Abbildung 4.30. sind die Mittelwerte des ermittelten Proliferationsindex von zwei unabhängigen Versuchen dargestellt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen können zudem in Tabelle 4.13. abgelesen werden. Die minimale Tierzahl, die zur Ermittlung der Mittelwerte und Standardabweichungen herangezogen wurde, lag bei 7 Tieren.

Zum Ende des Versuches (fünf Tage nach Therapieende) konnte die Behandlung mit dem Zytostatikum Etoposid weder in Mono- noch in Co-Tumoren die Proliferationsrate senken. Es bestand somit in der Proliferation von Mono- und Co-Tumoren nach Etoposidbehandlung kein signifikanter Unterschied.

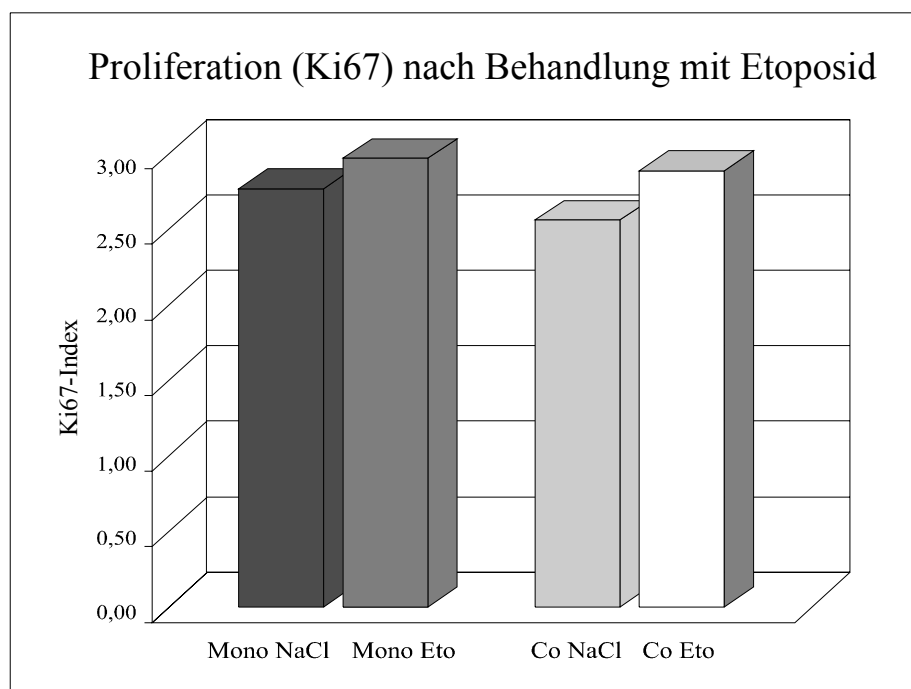


Abb. 4.30.: Vergleich der Proliferation (Ki67-Färbung) von Mono- und Co-Tumoren nach Behandlung mit Etoposid bzw. 0,9%iger Natriumchloridlösung  
Etoposid senkt weder die Proliferation der Mono- noch der Co-Tumore.

Tab. 4.13: *Proliferation (Ki67-Färbung): Mittelwerte und Standardabweichungen von Mono- und Co-Tumoren nach Behandlung mit Etoposid bzw. 0,9%iger Natriumchloridlösung*  
 # = Vergleich Mono-NaCl zu Mono-Eto bzw. Co-NaCl zu Co-Eto: Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Tumore aus den mit 0,9%iger Natriumchloridlösung behandelten Tieren gegenüber dem Mittelwert der Tumore aus den mit Etoposid behandelten Tieren ist statistisch nicht signifikant.

	Mittelwert	Standard- abweichung	Anzahl
Mono NaCl	2,77	0,99	7
Mono Eto <sup>#</sup>	2,97	0,56	13
Co NaCl	2,56	0,62	9
Co Eto <sup>#</sup>	2,89	0,76	16

#### 4.4.6. Expression der Procaspasen 9, 3 und 7

Die Expression der Procaspasen sollte nicht nur in vitro, sondern auch in vivo beurteilt werden. Zu diesem Zweck wurde die Procaspase-Expression in den Tumoren des letzten Entnahmezeitpunktes aller drei Versuche immunhistologisch untersucht. Die Auswertung erfolgte wie unter Punkt 3.10.3.4. beschrieben.

Die Abbildung 4.31. zeigt die Mittelwerte für die Procaspasen 8, 9, 3 und 7 aus drei Versuchsdurchgängen. Zudem sind in der Tabelle 4.14. die Mittelwerte und Abweichungen gesondert aufgeführt. Die minimale Tierzahl zu einem Zeitpunkt, die zur Ermittlung der Mittelwerte und Standardabweichungen herangezogen wurde, lag bei 9 Tieren.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der in vitro Co-Kultur konnte auch bei der immunhistologischen Auswertung der tierexperimentellen Versuche eine erniedrigte Expression der Procaspasen 9, 3 und 7 in cokultivierten Panc89-Zellen festgestellt werden. Der Unterschied zwischen Mono- und Co-Tumoren war dabei für die Effektor-Caspasen 3 und 7 statistisch signifikant. Für die Procaspase 9 war ein Unterschied vorhanden, jedoch nicht statistisch signifikant. Eine verminderte Expression der Procaspase 8 konnte nicht gezeigt werden.



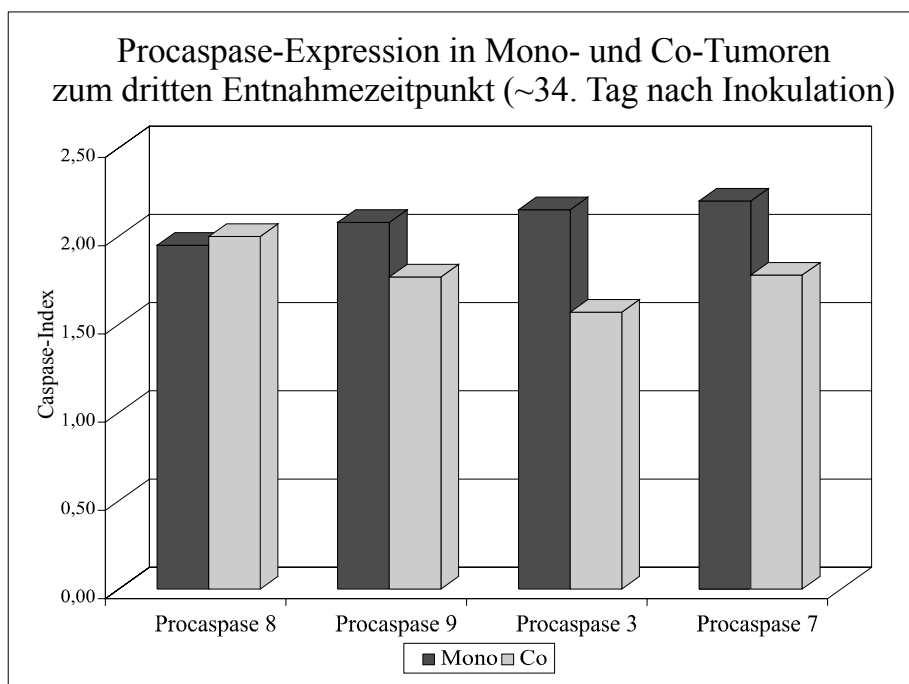


Abb. 4.31.: *Procaspase-Expression in Mono- und Co-Tumoren bei Versuchsende: Mittelwerte für die Procaspasen 8, 9, 3 und 7 aus drei Versuchen*

Die Expression der Procaspasen 3 und 7 ist in Co-Tumoren im Vergleich zu Mono-Tumoren signifikant vermindert, die der Procaspase 9 tendenziell vermindert und die der Procaspase 8 nicht vermindert.

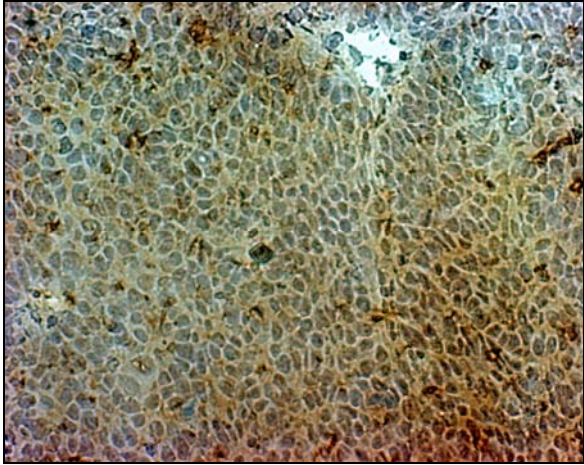
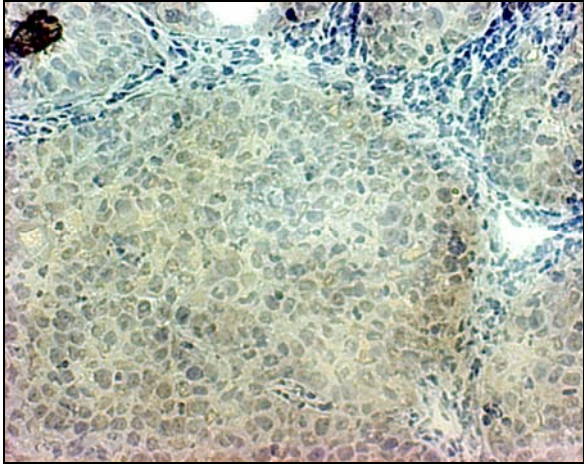
Tab. 4.14.: *Procaspase-Expression in Mono- und Co-Tumoren bei Versuchsende: Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Versuchen*

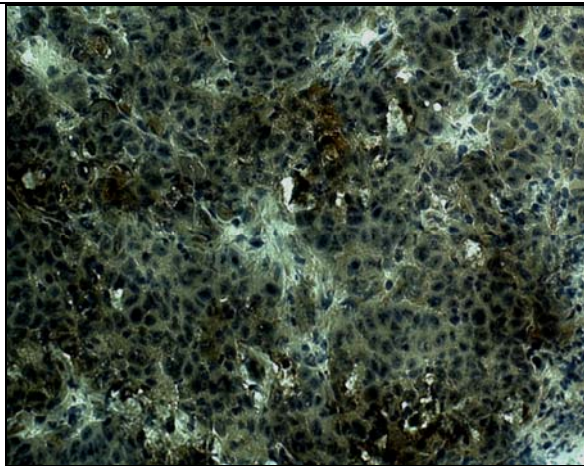
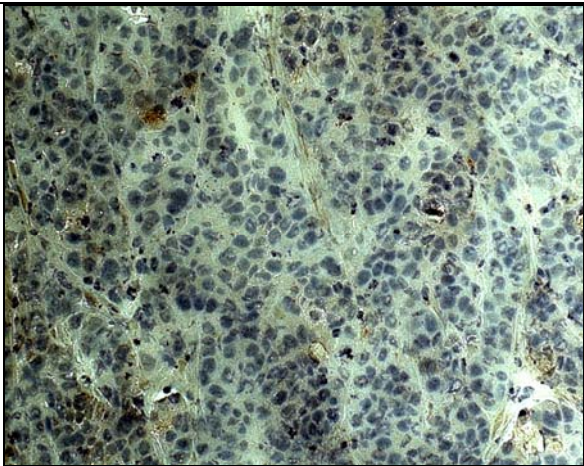
\* = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Panc89 Mono-Tumore und dem Mittelwert der Panc89 Co-Tumore ist statistisch signifikant mit  $p < 0,04$ .

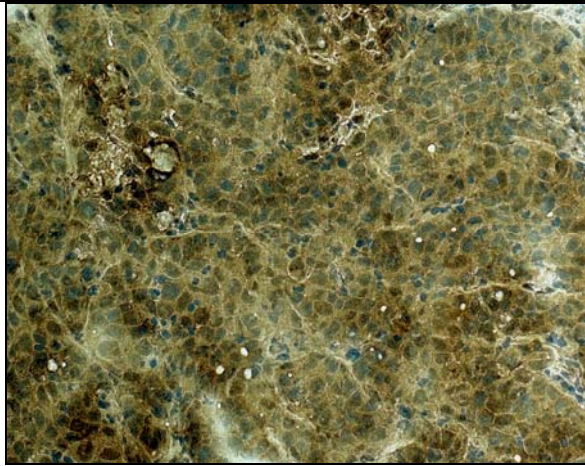
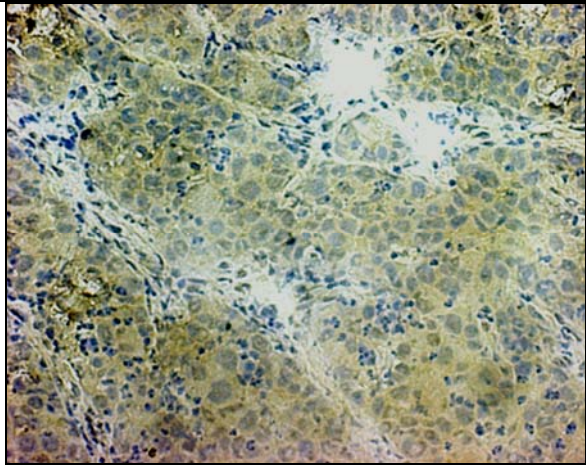
# = Der Unterschied zwischen dem Mittelwert der Panc89 Mono-Tumore und dem Mittelwert der Panc89 Co-Tumore ist statistisch nicht signifikant.

Procaspase		Mittelwert	Standard-abweichung	Anzahl
8 #	Mono	1,95	0,54	15
	Co	2,00	0,50	13
9 #	Mono	2,08	0,25	9
	Co	1,77	0,53	13
3 *	Mono	2,15	0,58	10
	Co	1,57	0,46	12
7 *	Mono	2,20	0,38	9
	Co	1,78	0,38	10

In den Abbildungen 4.32. bis 4.34. sind beispielhaft Procaspase-Färbungen von Mono- und Co-Tumoren in einer 250fachen Vergrößerung gezeigt.

Procaspase 9	
	
Abb. 4.32.A: <i>Färbung Procaspase 9 Mono-Tumor, 250fache Vergrößerung</i>	Abb. 4.32.B: <i>Färbung Procaspase 9 Co-Tumor, 250fache Vergrößerung</i>
Mono-Tumore (Bild links) zeigen eine deutliche Färbeintensität für die Procaspase 9. Die Färbeintensität ist in Co-Tumoren (Bild rechts) geringer als in Mono-Tumoren.	

Procaspase 3	
	
Abb. 4.33.A: <i>Färbung Procaspase 3 Mono-Tumor, 250fache Vergrößerung</i>	Abb. 4.33.B: <i>Färbung Procaspase 3 Co-Tumor, 250fache Vergrößerung</i>
Mono-Tumore (Bild links) zeigen eine deutliche Färbeintensität für die Procaspase 3. Die Färbeintensität ist in Co-Tumoren (Bild rechts) geringer als in Mono-Tumoren.	

Procaspase 7	
	
Abb. 4.34.A: <i>Färbung Procaspase 7</i> <i>Mono-Tumor, 250fache Vergrößerung</i>	Abb. 4.34.B: <i>Färbung Procaspase 7</i> <i>Co-Tumor, 250fache Vergrößerung</i>
Mono-Tumore (Bild links) zeigen eine deutliche Färbeintensität für die Procaspase 7. Die Färbeintensität ist in Co-Tumoren (Bild rechts) geringer als in Mono-Tumoren.	

---

## 5. Diskussion

Das exokrine Pankreaskarzinom -histologisch zumeist als duktales Adenokarzinom- stellt immer noch einen kaum zu therapierenden Tumor dar, der mit einer ausgesprochen niedrigen Fünf-Jahres-Überlebensrate (ca. 2%) die vierthäufigste Krebstodesursache bei Frauen und die fünfhäufigste bei Männern ist [Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2004; Bohmig and Rosewicz 2004].

Aufgrund des hohen Malignitätsgrades und des Fehlens spezifischer Symptome wird das duktales Pankreasadenokarzinom zumeist in einem bereits fortgeschrittenen Krankheitsstadium diagnostiziert [Brand and Tempero 1998], so dass für über 80 % der Patienten eine Tumoresektion mit kurativem Ansatz nicht in Frage kommt. Diese Patienten sind somit auf konventionelle Therapieformen, insbesondere die systemische Chemotherapie, angewiesen, deren Bedeutung aber vor allem in der Palliation liegt [Li et al. 2004; Schneider et al. 2005].

Ein Problem, das sich für die Therapie neben den häufig bei Erstdiagnose bereits vorliegenden Fernmetastasen ergibt, ist die schon bestehende oder im Verlauf der Therapie erworbene Resistenz der Tumore gegenüber Chemotherapeutika. Diese hat im wesentlichen ihre Ursache in der Protektion der Tumorzellen vor Zytostatika-induzierter Apoptose. Ein Ziel zur Verbesserung der Therapieeffizienz ist es folglich, die zugrunde liegenden Resistenzmechanismen aufzuklären, um die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber Zytostatika verstärken zu können.

Ein weiteres Merkmal des duktales Pankreasadenokarzinoms ist neben der ausgeprägten Chemoresistenz die starke desmoplastische Stromabildung. Der Anteil an neoplastischen Epithelzellen ist dabei deutlich geringer als der Anteil an Stromazellen, zu denen hauptsächlich nicht-neoplastische Fibroblasten, Endothelzellen und Leukozyten zählen [Ryu et al. 2001; Seymour et al. 1994].

Interaktionen zwischen den neoplastischen Pankreasepithelzellen und den zellulären und nicht zellulären Stromakomponenten können Einfluss auf verschiedene biologische Eigenschaften des Pankreaskarzinoms haben, und zwar auf das Wachstum [Hartel et al. 2004; Miyamoto et al. 2004], auf die Invasivität, die Migration und das angiogenetische Potential [Tomioka et al. 2001] sowie auf die Chemoresistenz [Miyamoto et al. 2004; Muerkoster et al. 2004].

Auch bei Zelllinien anderer Krebsarten wurde die Bedeutung von Tumor-Stroma-Interaktionen für die Ausprägung von Chemoresistenz untersucht. So zeigten z.B. mit

Prostatafibroblasten kokultivierte Prostatakarzinomzellen im Vergleich zu den monokultivierten Zellen eine signifikante Chemoresistenz gegenüber drei verschiedenen zytotoxischen Wirkstoffen [Zhu et al. 1999]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Stromazellen aus dem Knochenmark Myelomzellen vor Mitoxantron-induzierter Apoptose schützen [Nefedova et al. 2003].

Die beiden besonderen Charakteristika des duktales Pankreasadenokarzinoms, die ausgeprägte Apoptoseresistenz und die starke Stromabildung, standen im Mittelpunkt dieser Arbeit, in der die Bedeutung von Tumor-Stroma-Interaktionen bei der Entstehung und Manifestation von Chemoresistenz in Pankreaskarzinomzellen näher untersucht werden sollte.

Der Einfluss von Pankreasfibroblasten auf das Chemoresistenzverhalten von Pankreaskarzinomzellen wurde sowohl in einem mehrwöchigen in vitro Co-Kultursystem als auch durch tierexperimentelle Versuche untersucht. Als humane Pankreaskarzinomzelllinie wurde die chemosensitive Zelllinie Panc89 gewählt, weil bei dieser Zelllinie, die auf Apoptose-induktion durch Zytostatika gut anspricht, die Induktion von Chemoresistenz gut zu beobachten ist [Arlt et al. 2003; Arlt et al. 2001]. Als Stromakomponente kamen murine Pankreasfibroblasten zum Einsatz, die zuvor frisch aus Mäusen isoliert wurden und deren myofibroblastischer Phänotyp immunhistologisch bestätigt wurde (siehe Ergebnisse 4.1. und 4.2.). Der Speziesunterschied ermöglichte es, die zu untersuchenden Parameter einer epithelialen bzw. stromalen Herkunft zuzuordnen. Um der Tatsache der ausgeprägten Stromabildung beim Pankreaskarzinom annähernd gerecht zu werden, wurden anteilig zweieinhalb mal mehr Pankreasfibroblasten als Pankreaskarzinomzellen im Co-Kultursystem sowohl in vitro als auch in vivo eingesetzt.

Als Zytostatikum wurde der Topoisomerase II Inhibitor Etoposid gewählt, dessen Wirkmechanismus gut charakterisiert ist und der in chemosensitiven Pankreaskarzinomzellen deutlich Apoptose induziert.

Mittels einer Annexin V-FITC-/PI-Färbung in einem Fluoreszenz-Durchflusszytometer wurde der Einfluss von murinen Pankreasfibroblasten auf das Chemoresistenzverhalten von Panc89-Zellen im Verlauf über mehrere Wochen gemessen. Die Apoptoserate der kokultivierten Panc89-Zellen nach Behandlung mit Etoposid war gegenüber der Apoptoserate der monokultivierten Panc89-Zellen zu jedem Messzeitpunkt geringer, dabei war der Unterschied in fünf von sieben Wochen statistisch signifikant. Die Apoptoserate der kokultivierten



Panc89-Zellen betrug im Mittel der Wochen nur etwa ein Drittel der Apoptoserate der monokultivierten Zellen.

Die zu beobachtende Chemoresistenz der cokultivierten Panc89-Zellen ist spezifisch auf die Interaktion mit den Pankreasfibroblasten zurückzuführen. Artificielle Einflüsse des Transwellsystems konnten durch die Beobachtung ausgeschlossen werden, dass sich mit leeren Transwelleinsätzen kultivierte Panc89-Zellen in ihrer Chemosensitivität nicht von monokultivierten, also ohne Transwelleinsätze kultivierten Panc89-Zellen unterscheiden [Daten nicht gezeigt]. Die Co-Kultur enthält durch die Fibroblasten im Vergleich zur Monokultur insgesamt mehr Zellen, so dass den Tumorzellen in der Co-Kultur eventuell weniger Nährstoffe zur Verfügung stehen. Ob eine verminderte Proliferationsrate aufgrund von Nährstoffmangel für das verringerte Ansprechen auf die Zytostatikatherapie verantwortlich ist, konnte durch eine Testreihe ausgeschlossen werden, bei der den Panc89-Zellen nutritive Faktoren entzogen wurden. Zellen, die in Medien kultiviert wurden, deren Serumgehalt mit 1,5% deutlich unter dem üblichen Angebot von 10% Serum im Nährmedium lag, zeigten keine Veränderungen in einem Proliferations-Assay [Muerkoster et al. 2004]. Zusätzlich zeigte sich bei der Analyse der verschiedenen Co-Kultur-Versuchsdurchgänge keine Korrelation zwischen der Proliferationsrate und der Chemoresistenz [Daten nicht gezeigt].

Weiterhin zeigten Zelllinien anderer Krebsarten (Zervixkarzinom, Kolonkarzinom) in dem Co-Kultursystem mit murinen Pankreasfibroblasten keine Zunahme der Chemoresistenz und auch die Co-Kultivierung von Pankreaskarzinomzellen mit anderen Tumorzellarten im Transwellsystem vermochte keine Steigerung der Chemoresistenz in den Pankreaskarzinomzellen zu bewirken [unveröffentlichte Daten]. Die Zunahme der Chemoresistenz ist daher gebunden an die spezifische Kombination von Pankreaskarzinomzellen und Pankreasfibroblasten.

Mit der Annexin V-FITC-/PI-Färbung im Fluoreszenz-Durchflusszytometer konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Pankreaskarzinomzellen die Fähigkeit hatten, den resistenten Phänotyp auch nach Ende der Co-Kultur für zumindest eine Woche und teilweise auch noch über eine Woche hinaus zu erhalten. Die Resistenz war dabei allerdings weniger stark ausgeprägt als zur Zeit der Co-Kultur. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Interaktionen mit den murinen Pankreasfibroblasten reversible Veränderungen in den Panc89-Zellen bewirken, die in der Folge für eine gewisse Zeit auch unabhängig von den Fibroblasten zu einer Resistenz gegenüber Zytostatika-induzierte Apoptose führen.

Um den Einfluss von Tumor-Stroma-Interaktionen auf die Entstehung und Manifestation von Chemoresistenz beim Pankreaskarzinom auch in einem komplexen Organismus genauer nachvollziehen zu können, wurden tierexperimentelle Versuche durchgeführt. Dazu wurden weiblichen SCID-Mäusen subkutan in die rasierte und desinfizierte linke Flanke entweder  $5 \times 10^5$  Panc89-Zellen (Mono-Tumore) oder ein Gemisch aus  $5 \times 10^5$  Panc89-Zellen mit  $1,25 \times 10^6$  murinen Fibroblasten (Co-Tumore) injiziert. Die Tiere blieben zunächst unbehandelt und wurden bei Erreichen einer mittleren Tumorgroße von  $20 \text{ mm}^2$  in verschiedene Gruppen aufgeteilt. Im Anschluss erhielten die Mäuse entweder zwei je viertägige Behandlungszyklen mit dem Topoisomerase II Inhibitor Etoposid oder als Kontrolle Injektionen mit 0,9%iger Natriumchloridlösung. Die Tumore wurden entweder vor Beginn der Behandlung (dreizehn Tage und zwanzig Tage nach Inokulation) oder fünf Tage nach Ende der Behandlung (~34. Tag nach Inokulation) entnommen, vermessen und für immunhistologische Analysen schockgefroren.

SCID-Mäuse wurden gewählt, da diese durch ihr stark defizientes Immunsystem ein gutes Anwachsen der xenotransplantierten Tumore ermöglichen und sich bereits für verschiedene humane Tumormodelle -u.a. auch für das humane Pankreaskarzinom- als geeignet erwiesen haben. In Abwägung der Vor- und Nachteile der orthotopen versus der subkutanen Tumorinokulation wurde die subkutane Methode gewählt. Die subkutane Inokulation gewährt -anders als die orthotope Inokulation in das Pankreas der Maus- die Möglichkeit zur kontinuierlichen Wachstumskontrolle der Tumore und weist bei besserer Verträglichkeit für das Tier keine entscheidenden Nachteile für die Versuchsauswertung auf. Dem in vitro Co-Kulturmodell entsprechend wurden Zellen der humanen Pankreaskarzinomzelllinie Panc89 sowie frisch isolierte murine Pankreasfibroblasten in einem Verhältnis von 1:2,5 inokuliert. Diese Verteilung orientierte sich an dem Verhältnis von Tumor- und Stromazellen in humanen Pankreasadenokarzinomen.

Die Auswertung der Tumorgroßen ergab, dass sowohl die Mono- als auch die Co-Tumore exponentielles Wachstum zeigten, wobei die Wachstumskurve der Co-Tumore weniger stark anstieg als die der Mono-Tumore. Die Unterschiede waren jedoch zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant (siehe Ergebnisse 4.4.1.1.). Eine immunhistologische Färbung auf den Proliferationsmarker Ki67 zeigte ebenfalls erkennbar aber nicht signifikant mehr proliferierende Zellen in der Mono-Kultur als in der Co-Kultur (siehe Ergebnisse 4.4.1.2.).

Zur Differenzierung des epithelialen (= humane Pankreaskarzinomzellen) Anteils und des stromalen (= murine Pankreasfibroblasten) Anteils der Tumore wurden immunhistologische Färbungen auf Pan-Cytokeratin und " *$\alpha$ -Smooth Muscle Actin*" ( $\alpha$ -SMA) durchgeführt. Der

Anteil an epithelialen, Cytokeratin-positiven Zellen lag anfangs in den Co-Tumoren geringfügig unter dem entsprechenden Anteil in den Mono-Tumoren, doch zum Ende des Versuches unterschieden sich in diesem Punkt Co- und Mono-Tumore nicht mehr voneinander. Insgesamt nahm der Anteil an Karzinomzellen im Verhältnis zum Stroma in den Tumoren im Laufe der Zeit leicht zu (siehe Ergebnisse 4.4.2.1.). In den Co-Tumoren war erwartungsgemäß der Anteil des Stromas, das in diesem Modell durch  $\alpha$ -SMA-positive Fibroblasten repräsentiert wird, zunächst signifikant höher als in den Mono-Tumoren, ehe sich die Co-Tumore in bezug auf ihren Stromaanteil im Verlauf des Versuches den Mono-Tumoren angleichen (siehe Ergebnisse 4.4.2.2.). Das ursprünglich gewählte Verhältnis von der einfachen Anzahl Pankreaskarzinomzellen zu der zweieinhalbfachen Anzahl Pankreasfibroblasten wurde in diesem in vivo Modell mit der Zeit durch das schnelle Wachstum der Panc89-Zellen zugunsten des Tumoranteils verschoben. Durch die Ausbildung eines Stromas auch in den Mäusen mit Mono-Tumoren unterschied sich das gewählte in vivo Modell in diesem Punkt von dem in vitro Co-Kultursystem, in welchem die monokultivierten Panc89-Zellen ohne jede Stromakomponente kultiviert wurden.

Die Auswertung der Tumorumfänge nach zwei viertägigen Behandlungszyklen mit Etoposid ergab, dass die Co-Tumore deutlich weniger auf die Zytostatikatherapie ansprachen als die Mono-Tumore. Bei den Mono-Tumoren führte die Behandlung zu einer signifikanten Reduktion des mittleren Tumorumfanges um 46,1% von 1548 mm<sup>3</sup> auf 834 mm<sup>3</sup>, während bei den Co-Tumoren nur eine geringe Abnahme des mittleren Tumorumfanges um 13,9% von 1487 mm<sup>3</sup> auf 1281 mm<sup>3</sup> festgestellt werden konnte (siehe Ergebnisse 4.4.3.).

Die Abnahme des mittleren Volumens in den behandelten Tumoren kann auf eine erhöhte Apoptoserate oder auf eine verminderte Proliferationsrate nach der Etoposidbehandlung zurückzuführen sein. Zur Klärung wurde ein TUNEL-Assay zur Detektion apoptotischer Zellen im Tumorgewebe sowie eine immunhistologische Färbung auf den Proliferationsmarker Ki67 angefertigt. Während die Zytostatikabehandlung weder die Proliferation der Mono- noch der Co-Tumore hemmen konnte (siehe Ergebnisse 4.4.5.), reagierten die Mono-Tumore auf die Etoposidbehandlung mit einer deutlichen Zunahme an apoptotischen Zellen von im Mittel 2,78 auf 4,81 apoptotische Zellen pro HPF, die Co-Tumore zeigten dagegen keine Zunahme der apoptotischen Zellen (siehe Ergebnisse 4.4.4.). Der nur in den Mono-Tumoren zu beobachtende Behandlungseffekt beruhte demnach auf einer verstärkten Apoptoseinduktion und nicht auf einer Proliferationsinhibition.

Der stärkere Etoposideffekt in den schneller wachsenden Mono-Tumoren kann zum Teil auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass Zytostatika in Zellen mit hoher Teilungsrate mehr



Wirkung zeigen. Da die Wachstumsunterschiede zwischen den Mono- und Co-Tumoren nicht so groß waren, um allein dadurch eine derart starke Differenz in der Reaktion auf die Zytostatikatherapie erklären zu können, müssen weitere Mechanismen für die Resistenz der Co-Tumore verantwortlich sein.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sowohl in dem mehrwöchigen Co-Kultursystem *in vitro* als auch in den tierexperimentellen Versuchen *in vivo* eine deutliche Zunahme der Apoptoseresistenz nach Zytostatikabehandlung in den mit Pankreasfibroblasten kokultivierten bzw. coinokulierten Panc89-Zellen zu beobachten war. Auf welchem Wege die mehrwöchigen Tumor-Stroma-Interaktionen diese Apoptoseresistenz vermitteln, war Gegenstand weiterer Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit.

Für ein einwöchiges *in vitro* Co-Kultursystem bestehend aus Pankreaskarzinomzellen und murinen Pankreasfibroblasten konnte in der Kieler Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass die Zunahme an Chemoresistenz auf einer Erhöhung der NF- $\kappa$ B-Basalaktivität in den Pankreaskarzinomzellen beruht, die durch einen autokrinen IL1 $\beta$ -Regelkreis aufrecht erhalten wird [Arlt et al. 2002; Muerkoster et al. 2004]. Eine konstitutiv erhöhte Aktivität von NF- $\kappa$ B in vielen Pankreaskarzinomzelllinien bedingt eine Resistenz gegenüber zahlreichen Zytostatika unterschiedlicher Substanztypen (u.a. Etoposid, Gemcitabine, 5'-Fluorouracil, Doxorubicin). Entsprechend führt die pharmakologische und molekulare Inhibition von NF- $\kappa$ B in diesen Zellen zur Sensitivierung gegenüber Zytostatika, verbunden mit einer verstärkten Induktion von Apoptose *in vitro* und *in vivo* [Arlt et al. 2003; Arlt et al. 2001; Muerkoster et al. 2003].

In dem mehrwöchigen Co-Kulturmodell dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass die kokultivierten Pankreaskarzinomzellen im Vergleich zu den monokultivierten Pankreaskarzinomzellen tendenziell sowohl eine erhöhte NF- $\kappa$ B Basalaktivität als auch eine gesteigerte IL1 $\beta$ -Sekretion aufwiesen. Allerdings konnte diese Beobachtung nur in der ersten Woche der Co-Kultur gemacht werden, im Verlauf der weiteren Wochen wurde zwar eine moderate Erhöhung der NF- $\kappa$ B Basalaktivität gemessen, die IL1 $\beta$ -Sekretion sank in den kokultivierten Tumorzellen jedoch unter das Level der monokultivierten Tumorzellen (siehe Ergebnisse 4.3.2. und 4.3.3.).

Der auf NF- $\kappa$ B und IL1 $\beta$  beruhende Mechanismus könnte somit die über den gesamten Zeitraum der Co-Kultur zu beobachtende Chemoresistenz initiieren. Im weiteren Verlauf der Co-Kultur kommt es vermutlich zu einer Selektion resistenter Tumorzellen, so dass die Chemoresistenz in der Folge von anderen Mechanismen, die die Pankreaskarzinomzellen vor

Zytostatika-induzierter Apoptose schützen, aufrecht erhalten wird. Ob diese im folgenden beschriebenen molekularen Veränderungen in kokultivierten Panc89-Zellen durch NF- $\kappa$ B und IL1 $\beta$  initiiert werden oder sich unabhängig von diesem autokrinen Regelkreis entwickeln, ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mit murinen Pankreasfibroblasten kokultivierten humanen Pankreaskarzinomzellen im Vergleich zu monokultivierten Zellen geringere Level an Proenzym sowohl der Initiator-Caspasen 8 und 9 als auch der Effektor-Caspasen 3 und 7 enthielten. Die deutlich gesenkte Expression der Procaspasen wurde auf Proteinebene nach der zweiten Woche der Co-Kultur sichtbar, auf mRNA-Ebene bereits nach der ersten Woche der Co-Kultur (siehe Ergebnisse 4.3.4. und 4.3.5.). Zudem erhielten Panc89-Zellen im Anschluss an eine zumindest zweiwöchige Co-Kultivierung für eine gewisse Zeit nicht nur ihren chemoresistenten Phänotyp aufrecht, sondern zeigten überwiegend auch weiterhin erniedrigte Proteinlevel der genannten Procaspasen (siehe Ergebnisse 4.3.4.).

Die Aktivierung der Caspasen war in kokultivierten Panc89-Zellen im Vergleich zu monokultivierten Panc89-Zellen nur geringfügig und statistisch nicht signifikant herabgesetzt (siehe Ergebnisse 4.3.4.2.).

Die Tumore aus den tierexperimentellen Versuchen wurden ebenfalls auf die Expression der Procaspasen 8, 9, 3 und 7 untersucht. Die immunhistologischen Färbungen der Tumorschnitte zeigten für die Co-Tumore im Vergleich zu den Mono-Tumoren in Übereinstimmung mit den Befunden in vitro eine verminderte Expression der Procaspasen 9, 3 und 7. Der Unterschied zwischen Mono- und Co-Tumoren war dabei für die Effektor-Caspasen 3 und 7 statistisch signifikant. Für die Procaspase 9 war ein Unterschied vorhanden, jedoch nicht statistisch signifikant. Eine verminderte Expression der Procaspase 8 konnte nicht gezeigt werden.

Initiator- und Effektor-Caspasen steuern als zentrale Schaltstellen in einer Enzymkaskade den kontrollierten Ablauf der Apoptose. Die Caspasen ihrerseits unterliegen einer Vielzahl an Regulationsmechanismen, die besonders die Aktivierung aber auch die Expression der Caspasen betreffen. Eine verringerte Aktivierung -vor allem der Caspase 3- durch ganz unterschiedliche Mechanismen ist schon in zahlreichen Tumorzelllinien detektiert worden, u.a. in einem Co-Kulturmodell bestehend aus Neuroblastomzellen und Hepatozyten [Beierle et al. 2002]. Da die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Manifestation von Apoptoseresistenz durch Tumor-Stroma-Interaktionen nicht in erster Linie durch eine verminderte Aktivierung von Caspasen vermittelt zu werden scheint, sondern durch

erniedrigte Expressionslevel der Procaspasen, soll im folgenden die Regulation der Caspase-Expression im Vordergrund stehen.

Für verschiedene Caspasen konnte in anderen Arbeiten bereits gezeigt werden, dass ein Absenken des Procaspase-Levels zu einer verringerten Apoptoseantwort führt. So wird die Expression der Procaspase 8 durch TGF- $\beta$  herunterreguliert, was in follikularen dendritischen Zellen zur Inhibition von Fas-vermittelter Apoptose führt [Park et al. 2005]. Auch in unserem Co-Kultursystem konnte durchgehend eine bis zu vierfach erhöhte TGF- $\beta$ -Sekretion in den cokultivierten Panc89-Zellen festgestellt werden, so dass nicht auszuschließen ist, dass TGF- $\beta$  zu der Apoptoseresistenz der cokultivierten Zellen beiträgt [Daten nicht gezeigt]. In der Leukämiezelllinie HL-60 wurde nachgewiesen, dass die Herunterregulation der Procaspase 8 durch die "*Focal Adhesion Kinase*" (FAK) diese Zellen vor TRAIL-induzierter Apoptose bewahrt [Tamagiku et al. 2004]. Für die Caspase 9 konnte gezeigt werden, dass eine niedrige Expression des Proenzym, die durch den Transkriptionsfaktor AP-4 gesteuert wird, vor Glukokortikoid-induzierter Apoptose schützt [Tsujimoto et al. 2005]. Auch bei der Effektor-Caspase 3 konnten reduzierte Level an Procaspase in Mammakarzinomen [Devarajan et al. 2002] und hepatozellulären Karzinomen [Fujikawa et al. 2000] detektiert und mitverantwortlich für eine verringerte Apoptoseinduktion gemacht werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Caspase 1 $\alpha$  in Ovarialkarzinomzelllinien gegenüber nicht tumorigenen Ovarialepithelzellen herunterreguliert war und eine Überexpression zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoseantwort führte [Feng et al. 2005].

Ursächlich für die erniedrigten Caspase-Expressionslevel können verschiedene Mechanismen auf transkriptionaler, posttranskriptionaler und posttranslationaler Ebene sein.

Caspasen werden wie viele Proteine durch Ubiquitinierung und proteasomalen Abbau reguliert [Friedman and Xue 2004]. Als posttranslationaler Regulationsmechanismus kommt daher eine verstärkte proteasomale Degradation der Procaspasen sowie deren regulativer Proteine in Frage. So korreliert die beschleunigte Degradation der Procaspase 8 in einer humanen Kolonkarzinomzelllinie mit der Resistenz gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose [Zhang et al. 2005]. Eine wesentliche Rolle spielen hierbei die Mitglieder der IAP-Familie (u.a. cIAP1, cIAP2 und XIAP), die eine RING-Domäne besitzen, durch welche sie Caspasen sowie deren Aktivatoren ubiquitinieren und dem proteasomalen Abbau zuführen können. Daneben hemmen sie durch die Bindung ihrer BIR-Domäne sowohl die Aktivierung der

Caspasen 3, 7 und 9 als auch die enzymatische Aktivität der bereits aktiven Formen der genannten Caspasen [Friedman and Xue 2004; Riedl and Shi 2004].

In unserem Co-Kulturmodell konnten in Western Blot Analysen weder für cIAP1 noch für XIAP Expressionsunterschiede zwischen den kokultivierten und den monokultivierten Panc89-Zellen ausgemacht werden. cIAP2 war in der Co-Kultur sogar weniger exprimiert als in der Mono-Kultur (siehe Ergebnisse 4.3.4.3.). Eine mögliche Begründung hierfür liegt darin, dass sich in den resistenten Zellen parallel mit der Caspase-Expression auch die cIAP2-Expression verringert hat, da bei erniedrigter Caspasemenge auch eine geringere Menge dieses Caspase-Inhibitors benötigt wird, um die Zelle vor Apoptose zu schützen. Die Veränderungen der cIAP2-Expression, die durch die Co-Kultur auftreten, spielen somit ebenso wie die in ihrer Expression unveränderten cIAP1 und XIAP für die Resistenzvermittlung durch Tumor-Stroma-Interaktionen in Panc89-Zellen keine entscheidende Rolle.

Ferner konnten die Proteinlevel der Procaspasen in den kokultivierten Panc89-Zellen durch den Einsatz des Proteasominhibitors MG132 nicht auf das Niveau der monokultivierten Panc89-Zellen angehoben werden, so dass eine gesteigerte proteasomale Degradation nicht der Grund für die verringerte Caspase-Expression in den kokultivierten Pankreas-karzinomzellen zu sein scheint (siehe Ergebnisse 4.3.4.4.). Diese These wird durch die Tatsache unterstützt, dass nicht nur die Proteinlevel der Procaspasen, sondern auch deren mRNA in kokultivierten Panc89-Zellen herunterreguliert ist.

Eine weitere Form der posttranslationalen Regulation von Caspasen ist die Hemmung ihrer Aktivierung durch S-Nitrosylierung. Dabei wird durch Transfer einer NO-Gruppe an einen Thiolrest, der an dem Cystein des aktiven Zentrums der Caspase zu finden ist, die Proteinstruktur der Caspase und damit auch ihre Funktionsfähigkeit verändert, während die Expression der Procaspasen unverändert bleibt [Kim et al. 2002]. Für humane Cholangiokarzinomzelllinien konnte gezeigt werden, dass sowohl die Transfektion mit der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS) als auch die Behandlung der Zellen mit dem NO-Donor SNAP zur Nitrosylierung und damit zur eingeschränkten Aktivierung von Caspase 9 führte. Folge war eine verringerte Apoptoserate nach Behandlung der Zellen mit Etoposid [Torok et al. 2002]. Eine NO-abhängige Inhibition der Caspase-Aktivierung nach Etoposidbehandlung wurde ebenfalls in chemoresistenten Pankreaskarzinomzellen gefunden [Muerkoster et al. 2006]. Ferner wurde bereits in einem einwöchigen Co-Kulturmodell gezeigt, dass Pankreasfibroblasten unter Co-Kulturbedingungen vermehrt NO produzieren [Muerkoster et

al. 2004]. In dem Langzeit-Co-Kultursystem konnte diese Beobachtung vor allem in den zuerst co- dann wieder monokultivierten Panc89-Zellen (MaC-Zellen) gemacht werden [Daten nicht gezeigt]. Die geringfügig herabgesetzte Aktivierung der Caspasen in Langzeit-cokultivierten Panc89-Zellen und besonders in MaC-Zellen könnte somit möglicherweise auf S-Nitrosylierung des Cysteins der Caspasen zurückzuführen sein.

Die Aktivierbarkeit von Caspasen kann außerdem durch Phosphorylierung kontrolliert werden. Für die Caspase 9 ist beschrieben worden, dass deren Phosphorylierung durch den Erk1/Erk2-MAP-Kinase Signalweg zu einer verminderten Aktivierung führte, die durch den MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 wieder aufgehoben werden konnte [Allan et al. 2003]. Auch in cokultivierten Panc89-Zellen war der Erk1/Erk2-MAP-Kinase Signalweg aktiviert (siehe Ergebnisse 4.3.8.), und es war für die Caspase 9 eine verringerte, wenn auch statistisch nicht signifikant verringerte Aktivierung in cokultivierten Zellen zu beobachten (siehe Ergebnisse 4.3.4.2.). Zudem führte die Inhibition dieses Signalweges mittels PD98059 zu einer höheren Apoptoserate nach Etoposidbehandlung, so dass eine erniedrigte Aktivierbarkeit der Caspase 9 vermittelt durch Erk1/Erk2-abhängige Phosphorylierung zur Apoptoseresistenz in cokultivierten Panc89-Zellen beitragen könnte.

Neben den genannten posttranslationalen Regulationsmöglichkeiten kann die Expression der Procaspasen auch durch Mechanismen gesteuert werden, die auf posttranskriptionaler Ebene liegen.

Bei der Transkription entsteht zunächst ein primäres RNA-Transkript, das noch nicht zur Translation geeignet ist, da es neben codierenden Basensequenzen (= Exons) auch nicht-codierende Sequenzen (= Introns) enthält. Eine entscheidende posttranskriptionale Modifikation ist daher das "*splicing*", bei dem durch Exzision der Introns und Ligation der Exons mRNA hergestellt wird, deren Informationen in den anschließenden Schritten der Proteinbiosynthese abgelesen werden können. Bei dieser Prozessierung der RNA können Splicing-Varianten entstehen, durch die es zu unterschiedlichen mRNAs und damit auch zu unterschiedlichen Proteinen kommt. Alternatives Spleißen von mRNA-Transkripten stellt einen Regulationsmechanismus dar, durch den funktionell unterschiedliche Proteinisoformen exprimiert werden können. Für verschiedene Caspasen sind Splicing-Varianten beschrieben worden, z.B. für die Caspase 8 [Kisenge et al. 2003], die Caspase 9 [Johnson and Jarvis 2004] und die Caspase 3 [Vegran et al. 2005]. Splicing-Varianten können für das Co-Kultursystem nicht ausgeschlossen werden, waren jedoch nicht Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit.

Die dritte Ebene, auf der die Caspase-Expression reguliert werden kann, ist der Vorgang der Transkription selbst.

Die Transkription eines Gens wird durch epigenetische Prozesse beeinflusst. Die Epigenetik beschäftigt sich mit der Regulation der Genexpression und betrifft alle Vorgänge, die daran beteiligt sind, dass die in einem Gen kodierte Information realisiert oder nicht realisiert wird. Epigenetische Veränderungen sind reversibel und ermöglichen es den Zellen, auf Umweltveränderungen und Einflüsse zu reagieren, ohne dass es zu Veränderungen in der DNA-Sequenz kommt.

Die Genexpression kann durch verschiedene epigenetische Modifikationen kontrolliert werden, zu denen neben der Histondeacetylierung vor allem die DNA-Methylierung zählt.

DNA-Methylierung ist ein normaler postreplikatorischer Prozess, bei dem Methylgruppen mit Hilfe von DNA-Methyltransferasen an eine bestimmte Position des Cytosins (C5-Methylcytosin) in der DNA kovalent gebunden werden. Die Methylierung der DNA dient der Zelle zur Transkriptionskontrolle und wird in dieser Funktion vor allem in den Promotorregionen der zu regulierenden Gene eingesetzt. Dabei werden sogenannte Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-Inseln (CpG-Inseln) mit einem spezifischen Methylierungsmuster versehen, das bei der Replikation an die Tochterzellen weitergegeben wird. CpG-Inseln sind genomische Regionen mit statistisch erhöhter CpG-Dinukleotid-Dichte, deren Methylierungsmuster mit der Genexpression korreliert. So finden sich in gesunden Zellen, in denen viele Gene normal abgelesen werden, nur wenig methylierte CpG-Inseln, die einige ausgewählte Gene ruhigstellen. Auch CpG-Inseln in den Promotorregionen von *“housekeeping“* Genen, die in nahezu jeder Zelle exprimiert werden, sind nicht methyliert. Dagegen führt ein hoher DNA-Methylierungsgrad von Promotorregionen zum sogenannten *“gene silencing“*; d.h. er unterdrückt die Expression des betreffenden Gens [Momparler 2003]. Die Methylgruppen sind die direkte Ursache für die effektive Hemmung der Transkription, da durch diese der Zugang zur DNA für RNA-Polymerasen räumlich verhindert wird [Baylin 2005].

Neben der physiologischen Rolle, die die DNA-Methylierung bei der Kontrolle der Genexpression spielt, kann diese epigenetische Modifikation aber auch zur Tumorentstehung und -progression beitragen. Dieses geschieht, wenn die Promotorregionen wichtiger Gene, die in gesunden Zellen der Tumorentwicklung entgegen stehen, hypermethyliert und damit „ausgeschaltet“ werden. Es wird angenommen, dass Geninaktivierungen durch epigenetische Modifikationen mindestens im gleichen Maße zur Tumorentstehung beitragen wie Genmutationen. Die Inaktivierungen betreffen vor allem Gene, die eine Rolle bei der

Regulation des Zellwachstums, der Differenzierung, der Signaltransduktion und der DNA-Reparatur spielen [Baylin 2005].

Aberrante DNA-Methylierung von Promotorregionen wurde für viele verschiedene Gene, u.a. auch für die Caspase 8 beschrieben. Neuroblastomzellen, die sich resistent gegenüber Apoptoseinduktion sowohl durch Fas-Ligation als auch durch Doxorubicin zeigten, unterdrückten die Expression der Caspase 8 durch DNA-methylierungsbedingtes "*gene silencing*" [Teitz et al. 2000]. Für Retinoblastomzellen konnte gezeigt werden, dass deren Resistenz gegenüber Todesrezeptor-induzierter Apoptose durch eine defiziente Caspase 8 Expression aufgrund von DNA-Hypermethylierung begründet war [Poulaki et al. 2005]. Zudem konnte DNA-Hypermethylierung in Medulloblastom-, Rhabdomyosarkom- und Melanom-Zelllinien sowie in entsprechenden Tumorproben für eine verringerte Caspase 8 Expression verantwortlich gemacht werden. Die Re-Expression von Caspase 8 mittels des demethylierenden Agens 5-Aza-2'-deoxycytidine führte in diesen Zellen zu einer Sensitivierung gegenüber Todesrezeptor- und Zytostatika-induzierter Apoptose [Fulda et al. 2001]. Auch für einige Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms [Kanda et al. 2005], für die Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2 [Kanda et al. 2005] sowie für Glioblastome [Eramo et al. 2005] konnte gezeigt werden, dass der DNA-Methylierungsinhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine die entarteten Zellen für die Apoptoseinduktion sensitivierte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin bei mono- und kokultivierten Pankreaskarzinomzellen eingesetzt. 5-Azacytidin ist ein Basenanalogon, dessen metabolisierte und phosphorylierte Form das Cytosin in der DNA der behandelten Zellen ersetzt. Durch diese Veränderung werden DNA-Methyltransferasen irreversibel an den modifizierten DNA-Strang gebunden, so dass sie das nicht ersetzte, intakte Cytosin nicht mehr methylieren können und deshalb bei den folgenden Zellteilungen die Information, ob ein Cytosin methyliert ist oder nicht, nicht mehr an die Tochterzellen weitergegeben können. In der neu replizierten DNA ist dadurch signifikant weniger C5-Methylcytosin vorhanden. Vormalig abgeschaltete Gene werden auf diese Weise durch 5-Azacytidin wieder reaktiviert [Baylin 2005].

Die Vorbehandlung der Zellen mit 1  $\mu$ M 5-Azacytidin ließ die Apoptoserate der kokultivierten Panc89-Zellen nach einer Etoposidbehandlung signifikant ansteigen, die der monokultivierten Panc89-Zellen dagegen nicht (siehe Ergebnisse 4.3.7). Die MaC-Zellen wiesen nach Vorbehandlung mit 5-Azacytidin nur eine geringe Sensitivierbarkeit gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose auf.

Durch den Einsatz des DNA-Methylierungsinhibitors 5-Azacytidin konnten also die infolge der Co-Kultur resistent gewordenen Panc89-Zellen für eine Zytostatikabehandlung mit Etoposid wieder sensitiviert werden. Zusätzlich konnte mittels Western Blot Analyse gezeigt werden, dass die Verwendung von 5-Azacytidin die erniedrigten Expressionslevel der Procaspasen in den kokultivierten Panc89-Zellen wieder ansteigen ließ, während eine Auswirkung auf die monokultivierten Panc89-Zellen nicht zu beobachten war. Der Effekt bei den Initiator-Caspasen 8 und 9 war dabei deutlicher als bei den Effektor-Caspasen 3 und 7 (siehe Ergebnisse 4.3.6.). In den MaC-Zellen konnte nach Anwendung von 5-Azacytidin ein Ansteigen der Proteinlevel der Procaspasen nur teilweise beobachtet werden. Dieser Befund entsprach der geringen Sensitivierbarkeit der MaC-Zellen durch 5-Azacytidin gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass DNA-Methylierung an der durch Co-Kultur induzierten Herunterregulation der Procaspase-Expression beteiligt ist. Ob diese Form der epigenetischen Expressionskontrolle die Caspasen selbst oder Caspase-regulierende Gene betrifft, ist Gegenstand der aktuellen Forschung der Kieler Arbeitsgruppe.

Eine mögliche Kontrollfunktion bei dem Vorgang der DNA-Hypermethylierung kann für den Erk1/Erk2-MAP-Kinase-Signalweg vermutet werden, der in kokultivierten Panc89-Zellen vermehrt aktiviert war (siehe Ergebnisse 4.3.8.) und dessen Inhibition mittels PD98059 in kokultivierten Panc89-Zellen sowohl zu einer Sensitivierbarkeit gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose (siehe Ergebnisse 4.3.9.) als auch zu einem Ansteigen der Procaspase-Expression (siehe Ergebnisse 4.3.10.) führte. Für den Erk1/Erk2-MAP-Kinase-Signalweg konnte bereits gezeigt werden, dass dieser an der DNA-Hypermethylierung in Epithelzellen beteiligt ist, welche zum Ausschalten der Genexpression des proapoptotischen Proteins Par-4 führt [Pruitt et al. 2005]. Die Rolle des Erk1/Erk2-MAP-Kinase-Signalweges in kokultivierten Panc89-Zellen ist gleichfalls Gegenstand der aktuellen Forschung.

Die Bedeutung des Adhäsionsmoleküls L1CAM (CD171) bei der Entstehung und Manifestation von Apoptoseresistenz sollte ebenfalls genauer untersucht werden. Die Adhäsion sowohl an Komponenten der extrazellulären Matrix als auch an umliegende Zellen vermittelt Tumorzellen ein Überlebenssignal gegenüber physiologischen und chemotherapeutischen Apoptosemediatoren.

L1CAM ist ein Transmembran-Glykoprotein, das zur Immunglobulin-Superfamilie gehört. Es beeinflusst verschiedene Zellaktivitäten, indem seine extrazelluläre Domäne u.a. mit Molekülen der extrazellulären Matrix, anderen Adhäsionsmolekülen oder Zelloberflächen-



rezeptoren reagiert. L1CAM vermittelt dabei direkt oder indirekt Signale, die die Zelldifferenzierung, -proliferation, -migration und -invasion regulieren [Arlt et al. 2006].

L1CAM ist zuerst bei der neuralen Entwicklung und Neuroprotektion identifiziert worden, wurde jedoch auch in einer Reihe von Tumoren nachgewiesen, u.a. im malignen Melanom [Fogel, Mechtersheimer et al. 2003], im Nierenzellkarzinom [Allory et al. 2005], im Kolonkarzinom [Gavert et al. 2005] sowie im Ovarial- und Uteruskarzinom [Fogel, Gutwein et al. 2003].

Die tumorassoziierte Expression wird hauptsächlich mit der Fähigkeit von L1CAM in Verbindung gebracht, Zellmigration zu induzieren. Neben dem Einfluss auf die Tumorprogression und Metastasierung gewinnt allerdings auch die Bedeutung, die L1CAM bei der Zellproliferation und der Vermittlung von Apoptoseresistenz hat, immer mehr an Interesse. In einem Nacktmaus-Modell konnte durch den Einsatz eines monoklonalen Anti-L1CAM-Antikörpers das intraperitoneale Wachstum und die Metastasierung von humanen Ovarialkarzinomen effektiv gehemmt werden [Arlt et al. 2006]. Weiterhin zeigten Zellen der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 nach Behandlung mit siRNA gegen L1CAM eine bis zu vierfach erhöhte Apoptoseinduktion im Vergleich zu kontrolltransfizierten HCT116-Zellen [Gelman et al. 2004]. In Bezug auf die Apoptoseinduktion ist außerdem beschrieben, dass die durch L1CAM vermittelte Neuroprotektion in Zusammenhang mit der Aktivierung des Erk1/Erk2-MAP-Kinase-Signalweges sowie mit der Aktivierung von PKB/Akt steht; beides verbunden mit der verminderten Aktivierung von Caspase 9 [Loers et al. 2005]. Untersuchungen der Kieler Arbeitsgruppe zeigten, dass bei einer immunhistologischen Analyse von zwanzig humanen Pankreaskarzinomen 80% der Tumore eine deutliche L1-Expression in den Karzinomzellen aufwiesen [unveröffentlichte Daten]. Zur Klärung der Frage, ob L1CAM in die Vermittlung von Chemoresistenz in Pankreaskarzinomzellen involviert ist, wurden chemosensitive Pankreaskarzinomzellen mit L1CAM transfiziert und im Gegenzug auch chemoresistente Pankreaskarzinomzellen mit siRNA gegen L1CAM transfiziert. Die Transfektion von L1CAM in die chemosensitiven Pankreaskarzinomzellen reduzierte die Sensitivität dieser Zellen gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose, wohingegen die Transfektion der chemoresistenten Pankreaskarzinomzellen mit der L1CAM-siRNA diese Zellen gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose wieder sensitivierte [unveröffentlichte Daten].

Die Co-Kultur mit murinen Pankreasfibroblasten führte in den Zellen der humanen Pankreaskarzinomzelllinie Panc89 zu einer massiv gesteigerten Expression von L1CAM (siehe Ergebnisse 4.3.11.). Diese Steigerung der Expression war nicht nur in den direkt aus

der Co-Kultur aufgearbeiteten Zellen zu beobachten, sondern auch in jenen Zellen, die zuerst eine Zeit kokultiviert und schließlich wieder eine Woche monokultiviert wurden (MaC-Zellen). Diese Tatsache schließt aus, dass die Transwelleinsätze, die in der Co-Kultur verwendet wurden, einen artifiziellen Einfluss auf die Expression des Adhäsionsmoleküls L1CAM hatten, da die MaC-Zellen ohne Transwelleinsätze kultiviert wurden.

Die gesteigerte Expression von L1CAM in den kokultivierten Pankreaskarzinomzellen kann Ausdruck einer größeren Migrationsfähigkeit der kokultivierten Panc89-Zellen sein. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Beobachtung, dass Zellen aus der Co-Kultur eine deutlich erhöhte Sekretion des proangiogenetischen Interleukins 8 aufwiesen [Daten nicht gezeigt]. Daneben kann im Einklang mit der Veröffentlichung von Loers et al. 2005 auch im Co-Kultursystem sowohl die Aktivierung des Erk1/Erk2-MAP-Kinase-Signalweges (siehe Ergebnisse 4.3.8.) als auch eine herabgesetzte Aktivierung der Caspase 9 beobachtet werden (siehe Ergebnisse 4.3.4.2.). Es ist daher zu vermuten, dass L1CAM auch eine Rolle bei der durch Tumor-Stroma-Interaktionen vermittelten Chemoresistenz von Pankreaskarzinomzellen spielt. Dieser These wird gegenwärtig in weiteren Projekten der Kieler Arbeitsgruppe genauer nachgegangen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Tumor-Stroma-Interaktionen zu der Entstehung und Manifestation von Chemoresistenz in humanen Pankreaskarzinomzellen beitragen, was im Rahmen von in vitro und in vivo Untersuchungen gezeigt werden konnte. In humanen Pankreaskarzinomzellen, die dem Einfluss von Tumor-Stroma-Interaktionen durch eine Co-Kultivierung mit murinen Pankreasfibroblasten unterliegen, wird die Expression der Initiator-Caspasen 8 und 9 sowie der Effektor-Caspasen 3 und 7 als ein zentraler Mechanismus der Apoptoseresistenz herunterreguliert. Die Kenntnisse über molekulare Mechanismen, die der durch Tumor-Stroma-Interaktionen vermittelten Apoptoseresistenz in humanen Pankreaskarzinomzellen zugrunde liegen, dient dem Ziel, neue Therapiestrategien zur Durchbrechung der Chemoresistenz beim dukталen Pankreasadenokarzinom zu entwickeln.

---

## 6. Zusammenfassung

Die Therapie des duktales Pankreasadenokarzinoms zeigt nach wie vor kaum Aussichten auf Erfolg, resultierend in einer ausgesprochen niedrigen Fünf-Jahres-Überlebensrate von ca. zwei Prozent. Eine wesentliche Ursache für die geringe Therapieeffizienz liegt in der hohen Chemoresistenz von Pankreasadenokarzinomen. Diese Chemoresistenz basiert hauptsächlich auf der geringen Sensitivität gegenüber Zytostatika-induzierter Apoptose, die Pankreasadenokarzinome entweder schon zu Therapiebeginn aufweisen (intrinsische Resistenz) oder aber erst im Laufe der Therapie entwickeln (extrinsische Resistenz). Das duktales Pankreasadenokarzinom ist weiterhin vor allem durch eine massive desmoplastische Stromabildung gekennzeichnet, deren Folge ist, dass das Tumorstroma einen großen Einfluss auf die maligne Transformation des Gangepithels und dessen biologische Eigenschaften hat. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung von Tumor-Stroma-Interaktionen für die Entstehung und Manifestation von Chemoresistenz in humanen Pankreas-karzinomzellen untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass humane Pankreaskarzinomzellen, die durch Co-Kultivierung mit murinen Pankreasfibroblasten dem Einfluss von Tumor-Stroma-Interaktionen über mehrere Wochen ausgesetzt waren, sowohl in vitro als auch in vivo effektiv vor Zytostatika-induzierter Apoptose geschützt wurden. Als grundlegender Mechanismus dieser Apoptoseresistenz konnte eine erniedrigte Expression der Initiator-Caspasen 8 und 9 sowie der Effektor-Caspasen 3 und 7 in den kokultivierten Pankreaskarzinomzellen identifiziert werden. Die verminderte Expression der Procaspasen auf Proteinebene war dabei nicht bedingt durch eine veränderte proteasomale Degradation, sondern durch erniedrigte Level an Caspase-mRNA, resultierend aus einer verringerten Transkription der Caspase-Gene.

Die Resistenz sowie die herunterregulierte Expression der Procaspasen in den kokultivierten Pankreaskarzinomzellen konnte dabei mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin aufgehoben werden, so dass ein erhöhter DNA-Methylierungsgrad der Caspase-Gene selbst oder von Caspase-regulierenden Genen als Ursache der erniedrigten Caspase-Expression angesehen werden kann.

Diese Arbeit unterstreicht die Bedeutung von Tumor-Stroma-Interaktionen bei der Entstehung und Manifestation von Chemoresistenz in Pankreasadenokarzinomzellen in vitro und in vivo und trägt durch Aufdeckung molekularer Mechanismen der Caspaseregulation zum Verständnis der Chemoresistenz des duktales Pankreasadenokarzinoms bei.

---

## 7. Summary

Pancreatic carcinoma is the fourth leading cause of cancer death in women and the fifth leading cause of cancer death in men, being one of the most lethal human cancers. With conventional cancer treatments having only little impact on disease course the overall five-year survival rate is approximately two percent. Poor therapy outcome is due to a high incidence of metastatic disease at the time of diagnosis and a result of resistance to chemotherapy. One major mechanism by which tumor cells acquire a chemoresistant phenotype is the protection from drug-induced apoptosis. Resistance towards cytotoxic drugs can be present before the onset of chemotherapy (intrinsic) or develops during treatment course (extrinsic).

Pancreatic ductal adenocarcinoma is also characterized by a prominent desmoplastic reaction. Interactions of tumor cells and surrounding stroma (notably fibroblasts) are known to play a critical role in tumorigenesis and the induction of a malignant phenotype.

The role of tumor-stroma-interactions in development and manifestation of chemoresistance in human ductal pancreatic adenocarcinoma cells has been the subject of this thesis.

Human pancreatic carcinoma cells, which were under the influence of tumor-stroma-interactions by long term coculture with murine pancreatic fibroblasts, were effectively protected from drug-induced apoptosis *in vitro* and *in vivo*. Downregulation of the initiator caspases 8 and 9 as well as the effector caspases 3 and 7 in cocultured pancreatic carcinoma cells could be identified as the main mechanism leading to chemoresistance. The downregulated expression of procaspases was not due to enhanced protein turnover, but was caused by decreased transcription of caspase genes, resulting in low levels of mRNA.

Resistance to drug-induced apoptosis and downregulated expression of procaspases could be reversed by the methylation inhibitor 5-Azacytidine, assuming that an increased methylation of caspase genes or caspase-regulating genes are key events in downregulation of caspases and subsequent chemoresistance in pancreatic carcinoma cells.

This study underlines the importance of tumor-stroma-interactions in development and manifestation of chemoresistance in pancreatic carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. Additionally, the detection of molecular mechanisms regulating caspases essentially contributes to the understanding of chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma.

---

## 8. Literaturverzeichnis

Allan, L. A., N. Morrice, S. Brady, G. Magee, S. Pathak and P. R. Clarke (2003). "Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK." Nat Cell Biol **5**(7): 647-54.

Allory, Y., Y. Matsuoka, C. Bazille, E. I. Christensen, P. Ronco and H. Debiec (2005). "The L1 cell adhesion molecule is induced in renal cancer cells and correlates with metastasis in clear cell carcinomas." Clin Cancer Res **11**(3): 1190-7.

Arlt, A., A. Gehrz, S. Muerkoster, J. Vorndamm, M. L. Kruse, U. R. Folsch and H. Schafer (2003). "Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death." Oncogene **22**(21): 3243-51.

Arlt, A., J. Vorndamm, M. Breitenbroich, U. R. Folsch, H. Kalthoff, W. E. Schmidt and H. Schafer (2001). "Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin." Oncogene **20**(7): 859-68.

Arlt, A., J. Vorndamm, S. Muerkoster, H. Yu, W. E. Schmidt, U. R. Folsch and H. Schafer (2002). "Autocrine production of interleukin 1beta confers constitutive nuclear factor kappaB activity and chemoresistance in pancreatic carcinoma cell lines." Cancer Res **62**(3): 910-6.

Arlt, M. J., I. Novak-Hofer, D. Gast, V. Gschwend, G. Moldenhauer, J. Grunberg, M. Honer, P. A. Schubiger, P. Altevogt and A. Kruger (2006). "Efficient inhibition of intra-peritoneal tumor growth and dissemination of human ovarian carcinoma cells in nude mice by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibody treatment." Cancer Res **66**(2): 936-43.

Banerjee, D., P. Mayer-Kuckuk, G. Capiiaux, T. Budak-Alpdogan, R. Gorlick and J. R. Bertino (2002). "Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase." Biochim Biophys Acta **1587**(2-3): 164-73.

Baylin, S. B. (2005). "DNA methylation and gene silencing in cancer." Nat Clin Pract Oncol **2 Suppl 1**: S4-11.

Beierle, E. A., W. Dai, M. R. Langham, Jr., E. M. Copeland, 3rd and M. K. Chen (2002). "Caspase 3 expression is altered in a coculture model of neuroblastoma." J Surg Res **106**(2): 323-7.

Bohmig, M. and S. Rosewicz (2004). "[Pancreatic carcinoma]." Z Gastroenterol **42**(3): 261-8.

Boyce, M., A. Degterev and J. Yuan (2004). "Caspases: an ancient cellular sword of Damocles." Cell Death Differ **11**(1): 29-37.

Brand, R. E. and M. A. Tempero (1998). "Pancreatic cancer." Curr Opin Oncol **10**(4): 362-6.

Broker, L. E., F. A. Kruyt and G. Giaccone (2005). "Cell death independent of caspases: a review." Clin Cancer Res **11**(9): 3155-62.

Cole, S. P., G. Bhardwaj, J. H. Gerlach, J. E. Mackie, C. E. Grant, K. C. Almquist, A. J. Stewart, E. U. Kurz, A. M. Duncan and R. G. Deeley (1992). "Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line." Science **258**(5088): 1650-4.

de la Fuente, M. T., B. Casanova, J. V. Moyano, M. Garcia-Gila, L. Sanz, J. Garcia-Marco, A. Silva and A. Garcia-Pardo (2002). "Engagement of alpha4beta1 integrin by fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine." J Leukoc Biol **71**(3): 495-502.

Debatin, K. M. (2004). "Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy." Cancer Immunol Immunother **53**(3): 153-9.

Debatin, K. M. and P. H. Krammer (2004). "Death receptors in chemotherapy and cancer." Oncogene **23**(16): 2950-66.

Deng, C., Q. Lu, Z. Zhang, T. Rao, J. Attwood, R. Yung and B. Richardson (2003). "Hydralazine may induce autoimmunity by inhibiting extracellular signal-regulated kinase pathway signaling." Arthritis Rheum **48**(3): 746-56.

Devarajan, E., A. A. Sahin, J. S. Chen, R. R. Krishnamurthy, N. Aggarwal, A. M. Brun, A. Sapino, F. Zhang, D. Sharma, X. H. Yang, A. D. Tora and K. Mehta (2002). "Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance." Oncogene **21**(57): 8843-51.

Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." Genes Dev **13**(3): 239-52.

Duxbury, M. S., H. Ito, E. Benoit, T. Waseem, S. W. Ashley and E. E. Whang (2004). "A novel role for carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 as a determinant of gemcitabine chemoresistance in pancreatic adenocarcinoma cells." Cancer Res **64**(11): 3987-93.

Earnshaw, W. C., L. M. Martins and S. H. Kaufmann (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." Annu Rev Biochem **68**: 383-424.

Eramo, A., R. Pallini, F. Lotti, G. Sette, M. Patti, M. Bartucci, L. Ricci-Vitiani, M. Signore, G. Stassi, L. M. Larocca, L. Crino, C. Peschle and R. De Maria (2005). "Inhibition of DNA methylation sensitizes glioblastoma for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated destruction." Cancer Res **65**(24): 11469-77.

Erler, J. T., C. J. Cawthorne, K. J. Williams, M. Koritzinsky, B. G. Wouters, C. Wilson, C. Miller, C. Demonacos, I. J. Stratford and C. Dive (2004). "Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance." Mol Cell Biol **24**(7): 2875-89.

Fadeel, B., S. Orrenius and B. Zhivotovsky (1999). "Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony?" Biochem Biophys Res Commun **266**(3): 699-717.

Feng, Q., P. Li, C. Salamanca, D. Huntsman, P. C. Leung and N. Auersperg (2005). "Caspase-1alpha is down-regulated in human ovarian cancer cells and the overexpression of caspase-1alpha induces apoptosis." Cancer Res **65**(19): 8591-6.

Fogel, M., P. Gutwein, S. Mechtersheimer, S. Riedle, A. Stoeck, A. Smirnov, L. Edler, A. Ben-Arie, M. Huszar and P. Altevogt (2003). "L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas." Lancet **362**(9387): 869-75.

Fogel, M., S. Mechtersheimer, M. Huszar, A. Smirnov, A. Abu-Dahi, W. Tilgen, J. Reichrath, T. Georg, P. Altevogt and P. Gutwein (2003). "L1 adhesion molecule (CD 171) in development and progression of human malignant melanoma." Cancer Lett **189**(2): 237-47.

Friedman, J. and D. Xue (2004). "To live or die by the sword: the regulation of apoptosis by the proteasome." Dev Cell **6**(4): 460-1.

Fujikawa, K., K. Shiraki, K. Sugimoto, T. Ito, T. Yamanaka, K. Takase and T. Nakano (2000). "Reduced expression of ICE/caspase1 and CPP32/caspase3 in human hepatocellular carcinoma." Anticancer Res **20**(3B): 1927-32.

Fulda, S., M. U. Kufer, E. Meyer, F. van Valen, B. Dockhorn-Dworniczak and K. M. Debatin (2001). "Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer." Oncogene **20**(41): 5865-77.

Gasco, M. and T. Crook (2003). "p53 family members and chemoresistance in cancer: what we know and what we need to know." Drug Resist Updat **6**(6): 323-8.

Gatti, L. and F. Zunino (2005). "Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms." Methods Mol Med **111**: 127-48.

Gavert, N., M. Conacci-Sorrell, D. Gast, A. Schneider, P. Altevogt, T. Brabletz and A. Ben-Ze'ev (2005). "L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers." J Cell Biol **168**(4): 633-42.

Gelman, M. S., X. K. Ye, R. Stull, D. Suhy, L. Jin, D. Ng, B. Than, M. Ji, A. Pan, P. Perez, Y. Sun, P. Yeung, L. M. Garcia, R. Harte, Y. Lu, E. Lamar, R. Tavassoli, S. Kennedy, S. Osborn, D. J. Chin, K. Meshaw, T. A. Holzmayer, S. A. Axenovich and A. Abo (2004). "Identification of cell surface and secreted proteins essential for tumor cell survival using a genetic suppressor element screen." Oncogene **23**(49): 8158-70.

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. „Krebs in Deutschland“, 2004

Gukovskaya, A. S. and S. J. Pandol (2004). "Cell death pathways in pancreatitis and pancreatic cancer." Pancreatology **4**(6): 567-86.

Hartel, M., F. F. Di Mola, A. Gardini, A. Zimmermann, P. Di Sebastiano, A. Guweidhi, P. Innocenti, T. Giese, N. Giese, M. W. Buchler and H. Friess (2004). "Desmoplastic reaction influences pancreatic cancer growth behavior." World J Surg **28**(8): 818-25.

Hohenberger, W. and S. Kastl (2000). "[Neoadjuvant and adjuvant therapy of ductal pancreatic carcinoma]." Zentralbl Chir **125**(4): 348-55.

Huxley, R., A. Ansary-Moghaddam, A. Berrington de Gonzalez, F. Barzi and M. Woodward (2005). "Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies." Br J Cancer **92**(11): 2076-83.

Ichihashi, N. and Y. Kitajima (2001). "Chemotherapy induces or increases expression of multidrug resistance-associated protein in malignant melanoma cells." Br J Dermatol **144**(4): 745-50.

Jamroziak, K. and T. Robak (2004). "Pharmacogenomics of MDR1/ABCB1 gene: the influence on risk and clinical outcome of haematological malignancies." Hematology **9**(2): 91-105.

Johnson, C. R. and W. D. Jarvis (2004). "Caspase-9 regulation: an update." Apoptosis **9**(4): 423-7.

Kanda, T., M. Tada, F. Imazeki, O. Yokosuka, K. Nagao and H. Saisho (2005). "5-aza-2'-deoxycytidine sensitizes hepatoma and pancreatic cancer cell lines." Oncol Rep **14**(4): 975-9.

Kang, H. C., I. J. Kim, J. H. Park, Y. Shin, J. L. Ku, M. S. Jung, B. C. Yoo, H. K. Kim and J. G. Park (2004). "Identification of genes with differential expression in acquired drug-resistant gastric cancer cells using high-density oligonucleotide microarrays." Clin Cancer Res **10**(1 Pt 1): 272-84.

Kim, P. K., Y. G. Kwon, H. T. Chung and Y. M. Kim (2002). "Regulation of caspases by nitric oxide." Ann N Y Acad Sci **962**: 42-52.

Kisenge, R. R., H. Toyoda, J. Kang, S. Tanaka, H. Yamamoto, E. Azuma and Y. Komada (2003). "Expression of short-form caspase 8 correlates with decreased sensitivity to Fas-mediated apoptosis in neuroblastoma cells." Cancer Sci **94**(7): 598-605.

Kitazono, M., T. Sumizawa, Y. Takebayashi, Z. S. Chen, T. Furukawa, S. Nagayama, A. Tani, S. Takao, T. Aikou and S. Akiyama (1999). "Multidrug resistance and the lung resistance-related protein in human colon carcinoma SW-620 cells." J Natl Cancer Inst **91**(19): 1647-53.

Kornmann, M., K. D. Danenberg, N. Arber, H. G. Beger, P. V. Danenberg and M. Korc (1999). "Inhibition of cyclin D1 expression in human pancreatic cancer cells is associated with increased chemosensitivity and decreased expression of multiple chemoresistance genes." Cancer Res **59**(14): 3505-11.



---

Kroemer, G. and S. J. Martin (2005). "Caspase-independent cell death." Nat Med **11**(7): 725-30.

Larsen, A. K., A. E. Escargueil and A. Skladanowski (2000). "Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents." Pharmacol Ther **85**(3): 217-29.

Li, D., K. Xie, R. Wolff and J. L. Abbruzzese (2004). "Pancreatic cancer." Lancet **363**(9414): 1049-57.

Lillemoe, K. D., C. J. Yeo and J. L. Cameron (2000). "Pancreatic cancer: state-of-the-art care." CA Cancer J Clin **50**(4): 241-68.

Loers, G., S. Chen, M. Grumet and M. Schachner (2005). "Signal transduction pathways implicated in neural recognition molecule L1 triggered neuroprotection and neuritogenesis." J Neurochem **92**(6): 1463-76.

Lowenfels, A. B., P. Maisonneuve, G. Cavallini, R. W. Ammann, P. G. Lankisch, J. R. Andersen, E. P. Dimagno, A. Andren-Sandberg and L. Domellof (1993). "Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group." N Engl J Med **328**(20): 1433-7.

Lu, Q., A. Wu and B. C. Richardson (2005). "Demethylation of the same promoter sequence increases CD70 expression in lupus T cells and T cells treated with lupus-inducing drugs." J Immunol **174**(10): 6212-9.

Matsunaga, T., N. Takemoto, T. Sato, R. Takimoto, I. Tanaka, A. Fujimi, T. Akiyama, H. Kuroda, Y. Kawano, M. Kobune, J. Kato, Y. Hirayama, S. Sakamaki, K. Kohda, K. Miyake and Y. Niitsu (2003). "Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia." Nat Med **9**(9): 1158-65.

Miyamoto, H., T. Murakami, K. Tsuchida, H. Sugino, H. Miyake and S. Tashiro (2004). "Tumor-stroma interaction of human pancreatic cancer: acquired resistance to anticancer drugs and proliferation regulation is dependent on extracellular matrix proteins." Pancreas **28**(1): 38-44.

Mizutani, Y., H. Nakanishi, K. Yamamoto, Y. N. Li, H. Matsubara, K. Mikami, K. Okihara, A. Kawauchi, B. Bonavida and T. Miki (2005). "Downregulation of Smac/DIABLO expression in renal cell carcinoma and its prognostic significance." J Clin Oncol **23**(3): 448-54.

Momparler, R. L. (2003). "Cancer epigenetics." Oncogene **22**(42): 6479-83.

Monti, P., F. Marchesi, M. Reni, A. Mercalli, V. Sordi, A. Zerbi, G. Balzano, V. Di Carlo, P. Allavena and L. Piemonti (2004). "A comprehensive in vitro characterization of pancreatic ductal carcinoma cell line biological behavior and its correlation with the structural and genetic profile." Virchows Arch **445**(3): 236-47.

Morisaki, T. and M. Katano (2003). "Mitochondria-targeting therapeutic strategies for overcoming chemoresistance and progression of cancer." Curr Med Chem **10**(23): 2517-21.

Muerkoster, S., A. Arlt, B. Sipos, M. Witt, M. Grossmann, G. Kloppel, H. Kalthoff, U. R. Folsch and H. Schafer (2005). "Increased expression of the E3-ubiquitin ligase receptor subunit betaTRCP1 relates to constitutive nuclear factor-kappaB activation and chemoresistance in pancreatic carcinoma cells." Cancer Res **65**(4): 1316-24.

Muerkoster, S., A. Arlt, M. Witt, A. Gehrz, S. Haye, C. March, F. Grohmann, K. Wegehenkel, H. Kalthoff, U. R. Folsch and H. Schafer (2003). "Usage of the NF-kappaB inhibitor sulfasalazine as sensitizing agent in combined chemotherapy of pancreatic cancer." Int J Cancer **104**(4): 469-76.

Muerkoster, S., K. Wegehenkel, A. Arlt, M. Witt, B. Sipos, M. L. Kruse, T. Sebens, G. Kloppel, H. Kalthoff, U. R. Folsch and H. Schafer (2004). "Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta." Cancer Res **64**(4): 1331-7.

Muerkoster, S. S., J. Lust, A. Arlt, R. Hasler, M. Witt, T. Sebens, S. Schreiber, U. R. Folsch and H. Schafer (2006). "Acquired chemoresistance in pancreatic carcinoma cells: induced secretion of IL-1beta and NO lead to inactivation of caspases." Oncogene.

Mukai, M., A. Kanzaki, Z. S. Chen, H. Miyashita, T. Sumizawa, T. Furukawa, M. Haraguchi, Y. Takebayashi, H. Takamatsu and S. Akiyama (2002). "Enhanced nucleotide excision repair in cisplatin resistant human KB carcinoma cells." Oncol Rep **9**(4): 839-44.

Nefedova, Y., T. H. Landowski and W. S. Dalton (2003). "Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms." Leukemia **17**(6): 1175-82.

Park, S. M., S. Kim, J. S. Choi, D. Y. Hur, W. J. Lee, M. S. Lee, J. Choe and T. H. Lee (2005). "TGF-beta inhibits Fas-mediated apoptosis of a follicular dendritic cell line by down-regulating the expression of Fas and caspase-8: counteracting role of TGF-beta on TNF sensitization of Fas-mediated apoptosis." J Immunol **174**(10): 6169-75.

Park, S. Y., W. Lam and Y. C. Cheng (2002). "X-ray repair cross-complementing gene I protein plays an important role in camptothecin resistance." Cancer Res **62**(2): 459-65.

Poulaki, V., C. S. Mitsiades, C. McMullan, G. Fanourakis, J. Negri, A. Goudopoulou, I. X. Halikias, G. Voutsinas, S. Tseleni-Balafouta, J. W. Miller and N. Mitsiades (2005). "Human retinoblastoma cells are resistant to apoptosis induced by death receptors: role of caspase-8 gene silencing." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(1): 358-66.

Pruitt, K., A. S. Ulku, K. Frantz, R. J. Rojas, V. M. Muniz-Medina, V. M. Rangnekar, C. J. Der and J. M. Shields (2005). "Ras-mediated loss of the pro-apoptotic response protein Par-4 is mediated by DNA hypermethylation through Raf-independent and Raf-dependent signaling cascades in epithelial cells." J Biol Chem **280**(24): 23363-70.

---

Riedl, S. J. and Y. Shi (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 897-907.

Ryu, B., J. Jones, M. A. Hollingsworth, R. H. Hruban and S. E. Kern (2001). "Invasion-specific genes in malignancy: serial analysis of gene expression comparisons of primary and passaged cancers." Cancer Res **61**(5): 1833-8.

Savill, J. and V. Fadok (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." Nature **407**(6805): 784-8.

Schmid, R. M. and G. Adler (2000). "NF-kappaB/rel/IkappaB: implications in gastrointestinal diseases." Gastroenterology **118**(6): 1208-28.

Schneider, G. and R. M. Schmid (2005). "[Pathogenesis of the ductal pancreatic adenocarcinoma: implications for future therapies?]." Internist (Berl) **46**(2): 157-65.

Schneider, G., J. T. Siveke, F. Eckel and R. M. Schmid (2005). "Pancreatic cancer: basic and clinical aspects." Gastroenterology **128**(6): 1606-25.

Seymour, A. B., R. H. Hruban, M. Redston, C. Caldas, S. M. Powell, K. W. Kinzler, C. J. Yeo and S. E. Kern (1994). "Allelotype of pancreatic adenocarcinoma." Cancer Res **54**(10): 2761-4.

Shain, K. H. and W. S. Dalton (2001). "Cell adhesion is a key determinant in de novo multidrug resistance (MDR): new targets for the prevention of acquired MDR." Mol Cancer Ther **1**(1): 69-78.

Soengas, M. S. and S. W. Lowe (2003). "Apoptosis and melanoma chemoresistance." Oncogene **22**(20): 3138-51.

St Croix, B., V. A. Florenes, J. W. Rak, M. Flanagan, N. Bhattacharya, J. M. Slingerland and R. S. Kerbel (1996). "Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 on resistance of tumor cells to anticancer agents." Nat Med **2**(11): 1204-10.

St Croix, B. and R. S. Kerbel (1997). "Cell adhesion and drug resistance in cancer." Curr Opin Oncol **9**(6): 549-56.

Tamagiku, Y., Y. Sonoda, M. Kunisawa, D. Ichikawa, Y. Murakami, E. Aizu-Yokota and T. Kasahara (2004). "Down-regulation of procaspase-8 expression by focal adhesion kinase protects HL-60 cells from TRAIL-induced apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **323**(2): 445-52.

Teitz, T., T. Wei, M. B. Valentine, E. F. Vanin, J. Grenet, V. A. Valentine, F. G. Behm, A. T. Look, J. M. Lahti and V. J. Kidd (2000). "Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN." Nat Med **6**(5): 529-35.

- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." Science **281**(5381): 1312-6.
- Tomioka, D., N. Maehara, K. Kuba, K. Mizumoto, M. Tanaka, K. Matsumoto and T. Nakamura (2001). "Inhibition of growth, invasion, and metastasis of human pancreatic carcinoma cells by NK4 in an orthotopic mouse model." Cancer Res **61**(20): 7518-24.
- Torok, N. J., H. Higuchi, S. Bronk and G. J. Gores (2002). "Nitric oxide inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release by nitrosylating caspase 9." Cancer Res **62**(6): 1648-53.
- Townsend, D. M. and K. D. Tew (2003). "The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance." Oncogene **22**(47): 7369-75.
- Tsujimoto, K., T. Ono, M. Sato, T. Nishida, T. Oguma and T. Tadakuma (2005). "Regulation of the expression of caspase-9 by the transcription factor activator protein-4 in glucocorticoid-induced apoptosis." J Biol Chem **280**(30): 27638-44.
- Vegran, F., R. Boidot, C. Oudin, J. M. Riedinger and S. Lizard-Nacol (2005). "[Implication of alternative splice transcripts of caspase-3 and survivin in chemoresistance]." Bull Cancer **92**(3): 219-26.
- Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele and Z. N. Berneman (2005). "Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer." Ann Hematol.
- Wang, W., J. L. Abbruzzese, D. B. Evans, L. Larry, K. R. Cleary and P. J. Chiao (1999). "The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells." Clin Cancer Res **5**(1): 119-27.
- Zhang, K., M. Chew, E. B. Yang, K. P. Wong and P. Mack (2001). "Modulation of cisplatin cytotoxicity and cisplatin-induced DNA cross-links in HepG2 cells by regulation of glutathione-related mechanisms." Mol Pharmacol **59**(4): 837-43.
- Zhang, L., H. Zhu, F. Teraishi, J. J. Davis, W. Guo, Z. Fan and B. Fang (2005). "Accelerated degradation of caspase-8 protein correlates with TRAIL resistance in a DLD1 human colon cancer cell line." Neoplasia **7**(6): 594-602.
- Zhu, B., N. L. Block and B. L. Lokeshwar (1999). "Interaction between stromal cells and tumor cells induces chemoresistance and matrix metalloproteinase secretion." Ann N Y Acad Sci **878**: 642-6.

---

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich mit Rat und Tat, Geduld und Zuversicht unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heiner Schäfer, Leiter des Labors für Molekulare Gastroenterologie und Hepatologie, Allgemeine Innere Medizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie die hervorragende Betreuung während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit. Frau Dr. Susanne Sebens danke ich besonders für die ausgezeichnete Unterstützung der theoretischen und praktischen Arbeit sowie für die kritische Durchsicht der vorliegenden Dissertation. Herrn Prof. Dr. Ulrich R. Fölsch danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. Eberhard Burkhardt aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die Bereitschaft, die Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin zu vertreten.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe in Kiel recht herzlich für ihre Unterstützung und Hilfe beim Anfertigen dieser Arbeit und für das angenehme Arbeitsklima bedanken. Besonderer Dank gilt dabei Maike Witt für die geduldige Beantwortung zahlreicher Fragen sowie die Anleitung und Hilfe bei der Immunhistologie. Maike Großmann danke ich für die große Unterstützung bei der Realtime PCR. Für die Hilfe beim Kampf gegen die Tücken der Technik danke ich Jörg Minkenbergl.

Einen herzlichen Dank an meine Mitdoktorandinnen Anett Isberner, Jelena Lust, Ewelina Blaszczyk und Dorothee Koch für die humorvolle Arbeitsatmosphäre.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Wolfgang und Renate Werbing sowie meinem Freund Jens Schafstall. Meine Eltern haben mich immer bei der Verwirklichung meiner Ziele unterstützt und mir mein Studium und damit das Anfertigen dieser Arbeit ermöglicht. Meinem Freund danke ich für seine Aufmunterungen und die moralische Unterstützung während einiger Durststrecken sowie für seine Freude bei Erfolgen.

Danke auch an alle meine Freunde und Freundinnen sowie an die Mitglieder der „Muthesius-Schule-Mittagsrunde“, die stets ein offenes Ohr für mich hatten und durch zahlreiche Ratschläge zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.



## **Erklärung**

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

---

Veronika Werbing

édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5067-3



9 7 8 3 8 3 5 9 5 0 6 7 2